ORSAY
n° d'ordre : 2143

THESE

présentée

à l'UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

par

Brou KOUAME

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3e CYCLE
SPECIALITE : AMELIORATION DES PLANTES

BASES BIOCHIMIQUES DE L'HETEROSIS MITOCHONDRIAL CHEZ LE PALMIER A HUILE (ELAEIS GUINEENSIS - JACQ)

Soutenue le 7 juillet 1976 devant la Commission d'Examen

M. Y. DEMARLY — *Président*

M. G. DUCET
M. R. GAY
M. A. BERVILLE — *Examinateurs*

T H E S E

présentée

à 1'UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

par

Brou KOUAME

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3e CYCLE
SPECIALITE : AMELIORATION DES PLANTES

BASES BIOCHIMIQUES DE L'HETEROSIS MITOCHONDRIAL CHEZ LE PALMIER A HUILE (ELAEIS GUINEENSIS - JACQ)

Soutenue le juillet 1976 devant la Commission d'Examen

M. Y. DEMARLY		Président
M. G. DUCET M. R. GAY M. A. BERVILLE	}	Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MA CHERE NICOLE ET A NOTRE FILLE CHRISTELE

A MES PARENTS, EN TEMOIGNAGE DE MA SINCERE RECONNAISSANCE POUR LE SOUTIEN MATERIEL ET MORAL, QU'ILS M'ONT APPORTE TOUT LE LONG DE MES ETUDES

A TOUS MES AMIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548102_0026

Ce travail a été effectué sous l'égide du Ministère de la Recherche scientifique de Côte d'Ivoire et de l'I.R.H.O. (Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux)

Je tiens à remercier Monsieur Y. DEMARLY, Directeur du Laboratoire d'Amélioration des Plantes d'ORSAY pour m'avoir accueilli et permis, par ses conseils de mener à bien cette étude.

Je remercie aussi, Monsieur A. BERVILLE qui a consacré une grande partie de son temps pour suivre avec attention mon travail.

J'exprime ma gratitude à Monsieur M. OLLAGNIER Directeur des Recherches et des Stations Expérimentales de l'I.R.H.O. pour m'avoir offert l'occasion de travailler sur un sujet d'intérêt pratique pour la Côte d'Ivoire.

Que Monsieur G. DUCET Professeur au centre universitaire de LUMIGNY à Marseille veuille bien trouver ici l'expression de ma gratitude pour avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur R. GAY, Professeur à la Faculté de science de NANCY pour les conseils qu'il m'a donnés et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Que le Département Sélection de l'I.R.H.O. veuille trouver ici mon profond remerciement pour m'avoir fait profiter de ses conseils et de son expérience et pour le concours qu'il m'a apporté dans la réalisation de cette thèse.

.../.

Je tiens à remercier particulièrement la Station de La Mé qui m'a donné la possibilité de réaliser ce travail, qui m'a accueilli pour un stage de 2 mois et qui m'a toujours fourni avec régularité le matériel végétal dont j'avais besoin.

- S O M M A I R E -

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : APERCUS BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'HETEROSIS pages

Introduction 4

I - Les mitochondries 6

II - Les enzymes mitochondriaux 7

III - Hypothèse mitochondriale de l'hétérosis 7

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL VEGETAL

Introduction 9

I - Les inflorescences 10

II - Les graines 11

III - Les racines 14

TROISIEME PARTIE : METHODES EXPERIMENTALES

I - Isolement des mitochondries 17

II - Mesures des activités mitochondriales par polarographie 2

III - Dosages enzymatiques et colorimétriques 32

.../.

QUATRIEME PARTIE : RESULTATS ET INTERPRETATION pages

I - Résultats et interprétation sur inflorescences 42

II - Résultats et interprétation sur germes et racines 46

III - Action particulière du Malonate 58

IV - Le cytochrome oxydase - quelques résultats 60

CINQUIEME PARTIE : COMPARAISONS D'HYBRIDES

Introduction 66

I - Matériel végétal 66

II - Première expérience 68

III - Deuxième expérience 70

SIXIEME PARTIE : CONCLUSION 76

BIBLIOGRAPHIE

- A B R E V I A T I O N S -

ADP	ADENOSINE DIPHOSPHATE
ATP	ADENOSINE TRIPHOSPHATE
BSA	SERUM ALBUMINE BOVINE
EDTA	ETHYLENE DIAMINOTETRAACETIQUE
EGTA	ETHYLENE GLYCOLTETRAACETIQUE
αKGA	α CETOGLUTARATE
NADH	NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE
LDH	LACTATE DESYDROGENASE
PEP	PHOSPHOENOLPYRUVATE
PK	PYRUVATEKINASE
PVP	POLYVINYLROLIDONE
QO2	Microatomes d'oxygène par unité de temps
RC	Contrôle respiratoire
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminométhane
TES	N Tris (hydroxymethyl) methyl 2 aminoethane sulfonique

INTRODUCTION

Le laboratoire d'Amélioration des plantes dans lequel je travaille, s'occupe des mécanismes de la différenciation cellulaire et de la régulation génétique chez les végétaux supérieurs. Dans cette optique, le groupe de chercheurs avec lesquels je collabore, tente par des méthodes génétiques et biochimiques d'expliquer l'hétérosis et la stérilité mâle cytoplasmique.

Une plante mâle stérile ne produit pas de pollen ; les microspores avortent avant d'être fonctionnelles ; dans le cas de la stérilité mâle cytoplasmique, cette propriété est à hérédité maternelle ; la descendance du parent mâle stérile est entièrement mâle stérile.

Parmi les hypothèses expliquant la stérilité mâle (hypothèse du système nucléaire) l'hypothèse mitochondriale a été retenue par BERVILLE et DEMARLY (1970) : la stérilité mâle serait due à une mutation du D.N.A. au niveau des mitochondries, source d'énergie d'une cellule. (maïs, blé, féverole)

L'hétérosis est l'interprétation et l'expression biochimique de la vigueur hybride ; cette vigueur hybride se manifeste par un effet de stimulation des caractères morphologiques (poids - taille) et des caractères physiologique comme une germination plus rapide ou une vitesse de croissance plus élevée. Ces observations ont conduit plusieurs chercheurs à se pencher sur les causes profondes de cette vigueur hybride.

C'est ainsi que DEMARLY (1972) tente une approche de l'hétérosis en terme de régulation intra et intercellulaires, car la supériorité de l'hybride ne peut s'expliquer simplement par la dominance et la superdominance, les particules cytoplasmiques (mitochondrie, chloroplaste) joueraient un grand rôle dans l'expression de l'hétérosis.

Mac Daniel (1973) a appelé hétérosis mitochondrial, la supériorité fonctionnelle des mitochondries des hybrides manifestant l'hétérosis mesuré par l'activité respiratoire

.../.

et l'efficacité de la phosphorylation oxydative, comparée aux parents. Cette supériorité biochimique a été trouvée en bonne correlation avec la vigueur et le potentiel de production de l'hybride.

Le métabolisme respiratoire et plus particulièrement les activités oxydatives et phosphorylatives des mitochondries se sont avérées importantes pour mesurer la vigueur des semences hybrides présentant un hétérosis. (KRIDEL 1972) La supériorité biochimique d'hybrides de maïs hétérotiques par rapport à leurs parents a été démontrée (Mc DANIEL et al. 1968, SARKISSIAN et al. 1967)

Nos travaux ont porté sur le palmier à huile (Elaeis Guineensis) qui est une plante pérenne allogame monoïque. L'I.R.H.O. (Institut de Recherche pour les Huiles et Oléagineux) a adopté pour cette plante un schéma de sélection utilisant des tests d'hybrides pour la productivité car de nombreux caractères composant cette productivité ont des héritabilités faibles.

La possibilité de déceler à un stade jeune (graine, plantule) la valeur d'un génotype présente un interêt tout particulier pour cette plante étant donné la longueur des générations et l'importance des tests d'hybrides dans les programmes (il faut environ 1/2 ha durant 12 ans pour tester un hybride).

L'étude biochimique de l'hétérosis au niveau mitochondrial a donc été entreprise dans le but de trouver une relation entre le métabolisme mitochondrial et la vigueur hybride manifestée au champ afin de pouvoir utiliser cette relation dans les programmes d'amélioration.

L'objet principal de notre travail a donc été : d'étudier l'hétérosis mitochondrial en comparant les activités mitochondriales d'hybrides de palmiers à huile et celles de leurs parents ; de rechercher un test précoce qui nous permettrait de faire un tri dans un ensemble d'hybrides afin de ne retenir que les meilleurs.

Notre exposé sera divisé en six parties :

- dans la première partie, nous ferons une analyse bibliographique succinte sur les travaux interessant la vigueur hybride et l'hypothèse mitochondriale de l'hétérosis.

.../.

- la deuxième partie est consacrée à la description des organes végétaux utilisés pour nos travaux.;

- la troisième partie qui est consacrée aux méthodes et aux expériences réalisées comportera elle-même trois chapitres. Dans le premier, nous envisagerons l'isolement des mitochondries à partir d'inflorescences, de germes et de racines ; le second, sera réservé à la mesure des activités mitochondriales par polarographie ; le troisième chapitre est consacré aux dosages enzymatique et colorimètrique.

- Dans la quatrième partie, de notre travail, nous exposerons nos résultats et leur interprétation tant biologique que physiologique. Cette quatrième partie comprend deux chapitres. Le premier est réservé aux inflorescences. Le second est consacré aux germes et racines de graines germées.

- dans la cinquième partie, nous étudierons les activités mitochondriales d'hybrides testés en champ afin de comparer les résultats obtenus avec leurs valeurs agronomiques en particulier, la production de régimes.

- Enfin, la sixième partie sera réservée à une conclusion générale.

- Première Partie -

APERCUS BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'HETEROSIS

INTRODUCTION

La vigueur hybride est un phénomène qui a été observé à la fois chez les plantes et chez les animaux depuis plusieurs siècles (BREWBAKER 1964). D'après EAST et HAYES (1912), la vigueur hybride d'une plante hybride artificielle a été signalée pour la première fois par KOLREUTER en 1763.

Les termes vigueur hybride, hétérosis et hétérozygotie ont souvent été utilisés pour définir le même phénomène. Cependant les généticiens ont toujours essayé de différencier les 3 termes.

SHULL (1914) propose d'appeler hétérosis l'expression de l'accroissement de vigueur, de taille, de fertilité, de vitesse de croissance, de résistance aux maladies et aux insectes ainsi qu'aux accidents climatiques, manifestée par les organismes croisés par rapport aux lignées consanguines correspondantes et résultant spécifiquement d'une différence de constitution des gamètes parentaux qui s'unissent.

WHALEY (1944) définit la vigueur hybride comme étant la supériorité de l'hybride et l'hétérosis comme le mécanisme par lequel cette supériorité s'exprime.

Les diverses interprétations de l'hétérosis se fondent sur quatre mécanismes nucléaires : l'additivité, la dominance, la superdominance et l'épistasie.

KEEBLE et PELLEW (1910) interprètent la vigueur hybride comme un effet de la supériorité des allèles dominants par rapport aux allèles recessifs.

CROW (1952) propose une théorie de l'hétérosis basée sur la supériorité des génotypes hétérozygotes par rapport aux homozygotes. D'après JINKS (1964), cette supériorité peut être due en partie à l'épistasie.

JONES (1958) pense que les interactions alléliques sont responsables des effets hétérotiques.

Les aspects biochimiques et physiologiques de l'hétérosis ont été abordés par HAGEMAN et al. (1967) sur le maïs. Ils affirment que les métabolites et les enzymes qui participent aux voies photosynthétique, glycolytique et tricarboxylique sont contrôlés par des gènes dont l'action n'est généralement pas entièrement dominante. L'hybride a un système métabolique plus équilibré que ses parents et son activité enzymatique est généralement intermédiaire à celle de ses parents.

.../.

SRIVASTAVA (1970) a étudié les bases biochimiques de l'hétérosis mitochondrial chez le blé (Triticum aestivum) en comparant l'activité mitochondriale d'un hybride à celle de ses deux parents et il a montré que l'hybride a un hétérosis très positif au niveau mitochondrial et enzymatique.

Chez le palmier à huile, GASCON et al. (1966) ont montré que l'amélioration de production obtenue dans des hybrides entre origines non apparentées comparée aux croisements effectués au sein des origines était en partie le résultat d'un effet d'hétérosis et surtout le résultat d'une meilleure combinaison entre les composantes de la production.

I - LES MITOCHONDRIES

Plusieurs livres et de nombreux articles de revues ont été consacrés à la structure et aux fonctions des mitochondries, LENHINGER (1964).

Des aspects variés de recherches mitochondriales ont été abordés, GREEN (1969), HALL et PALMER (1969). Un volume entier de "Method in Enzymology" a été consacré à l'oxydation et à la phosphorylation mitochondriales ; des activités de mitochondries isolées de plantes sont également décrites par PULLMAN M.E. et al. (1967), CHANCE B. et al. (1968).

Le couplage de l'oxydation et de la phosphorylation utilisant les techniques polarographiques a été démontré, ERNSTER et al. (1964), WISKICH J.T., (1966).

Des techniques d'isolement de mitochondries de nombreuses plantes ont été étudiées, HAARD et al. (1968), KU et al. (1968), ROUMANI (1969), PALMER (1970).

SARKISSIAN et SRIVASTAVA (1968) ont mis au point une méthode rapide d'isolement de mitochondries de germes de blé présentant une bonne activité phosphorylante. Ces deux auteurs (1969) (1970) ont étudié les propriétés de mitochondries en utilisant les substrats du cycle de Krebs, des cofacteurs et des inhibiteurs. Ils ont émis l'hypothèse que les différences entre les vitesses d'utilisation des intermédiaires du cycle de KREBS par les mitochondries de plantes peuvent être interspécifique ou génotypique.

Il existe une diversité dans l'activité respiratoire des mitochondries issues d'espèces différentes de plantes. Par exemple, des mitochondries isolées de fruit de tomates, oxydent le malate et l'α cetoglutarate (KGA) à une vitesse égale au 1/4 de celle du succinate avec un contrôle respiratoire (RC) approchant l'infini, KU (1968). Les mitochondries isolées d'autres plantes peuvent oxyder le succinate, le malate et le NADH, c'est le cas des mitochondries de maïs.

.../.

II - LES ENZYMES MITOCHONDRIAUX

L'adénosine triphosphatase est importante dans le métabolisme des plantes car elle intervient dans la distribution de l'énergie de l'ATP, elle est associée aux réactions impliquant la phosphorylation et l'utilisation ou l'exigence de l'ATP. Des études sur l'ATPase mitochondriale des plantes ont été abordées par REID et al. (1964).

Le cytochrome oxydase est la principale oxydase terminale d'affinité élevée pour l'oxygène dans les métabolismes aérobies des animaux, plantes, levures et quelques ba bactéries. Chez les plantes, la cytochrome oxydase est uniquement présente dans les mitochondries, et les autres oxydases contenant du cuivre telles que les ascorbate oxydases ou phénolases jouent seulement un rôle mineur, SRERE (1965) cité par SRIVASTAVA (1970). Notons que récemment la cytochrome oxydase de levure a été purifiée, SEKUZU et al. (1967) et que l'activité de la cytochrome oxydase a été testée sur un extrait brut de mitochondries de plusieurs lignées de blé, SRIVASTAVA (1970).

Des méthodes de préparation du cytochrome oxydase ont été décrites par ESTABROOK (1967). On a constaté que des préparations purifiées de cytochrome oxydase contiennent des quantités variables de phospholipides, HORRIE (1963).

III - HYPOTHESE MITOCHONDRIALE DE L'HETEROSIS

Elle fait partie de l'hypothèse plus globale qui explique la vigueur hybride en faisant appel à la structure d'ensemble de l'organisme. La supériorité de l'hybride aurait pour fondement son contexte interne plus riche en types enzymatiques, ce qui lui conférerait une meilleure homéostase et partant une meilleure aptitude à exploiter ses capacités.

FINCHAN (1972) affirme que chez les espèces diploïdes de maïs, la sélection pour l'amélioration de la fonction enzymatique conduit vraisemblablement à l'établissement de nombreux allèles plus favorables à l'état hétérozygote qu'homozygote. Les résultats d'études de polymorphisme enzymatique par électrophorèse par exemple, sont en faveur de ces idées.

.../.

DEMARLY (1972), explique la vigueur hybride en se fondant sur le métabolisme et le système enzymatique au niveau des mitochondries.

Mc DANIEL et SARKISSIAN (1968), travaillant sur le maïs, ont obtenu des résultats en faveur de cette hypothèse. Ces auteurs ont étudié l'activité respiratoire et le rapport ADP/O et ils ont trouvé que les mitochondries des hybrides manifestent une supériorité biochimique par rapport à celle des parents.

D'autres résultats aboutissant à des conclusions analogues ont été obtenus par SARKISSIAN et al. (1971), SRIVASTAVA (1970), ZOBL et al. (1972), KRIDEL (1972) sur les mitochondries et le cytochrome oxydase.

Le modèle théorique proposé par DEMARLY (1972) est en accord avec l'hypothèse selon laquelle tout se jouerait au stade jeune, pendant les premières divisions du zygote.

Selon cette conception ontogénique, on peut imaginer qu'une différence même infime de nature métabolique en faveur de l'hybride peut donner une meilleure régulation interne dès le début de la reprise de la vie du zygote et que cela pourrait se prolonger jusqu'à un stade assez avancé de développement même jusqu'à la fin du cycle.

- Deuxième partie -

LE MATERIEL VEGETAL

INTRODUCTION

Le palmier à huile, Elaeis Guineensis est une monocotylédone appartenant à la famille des palmacées, tribu des Cocoïnèes et est d'origine strictement africaine où il s'étend à l'ouest sur environ 15° de part et d'autre de l'équateur. Son foyer botanique est vraisemblablement situé le long du Golfe de Guinée.

Le système racinaire est de type fasciculé, la majeure partie des racines nutritives est située dans les couches supérieures du sol (10 cm).

Le stipe peut atteindre 20 à 25 mètres de haut et il est couronné de 30 à 40 longues feuilles décombantes. Il porte à son extrémité l'apex qui est fortement protégé par les jeunes feuilles en formation.

La feuille adulte est formée d'un pétiole qui se prolonge par un rachis portant les folioles ; elle mesure de 5 à 7 mètres de long et pèse de 5 à 8 kg.

Les inflorescences prennent naissance à l'aisselle des feuilles. On distingue des inflorescences mâles et des inflorescences femelles. Au niveau de l'individu, il y a une succession de cycles mâles et femelles (monoecie) mais ces cycles ne se recouvrent pas (allogamie).

L'inflorescence femelle fécondée, appelée alors régime porte de 800 à 4 000 fruits. Le fruit est une drupe sessile ovoïde.

L'huile qui constitue le produit commercial de cette plante est obtenue à partir du mésocarpe ou pulpe du fruit (huile de palme) et de l'amande appelée palmiste (huile de palmiste).

Le palmier à huile est la plante dont la production d'huile par hectare est la plus importante, jusqu'à 6 tonnes par hectare et par an dans les meilleures conditions avec une moyenne mondiale proche de 3 tonnes. Rappelons que les productions moyennes d'huile par hectare et par an des plantes oléagineuses annuelles les plus importantes sont :

Sésame	420 kg
Colza	392 kg
Tournesol	308 kg
Arachide	230 kg
Soja	190 kg

.../.

Actuellement, le palmier à huile se situe à la troisième place pour la production mondiale d'huile :

Soja	8 570 000	tonnes d'huile
Tournesol	4 105 000	"
Palmier à huile	3 775 000	"
Arachide	3 225 000	"
Coton	2 955 000	"
Colza	2 550 000	"
Cocotier	2 495 000	"
Olivier	1 455 000	"

Nous avons utilisés différents organes du palmier à huile pour notre étude :

- des inflorescences
- des graines germées
- des racines

I - LES INFLORESCENCES

Les fleurs sont groupées en épis, eux-mêmes réunis en un énorme spadice qui se développe à l'aisselle de la feuille.

I-1 - L'inflorescence mâle

L'inflorescence mâle comporte, suivant les individus de 100 à 300 épillets, digitiformes de section plus ou moins polygonale, souvent aplatis en spatule dans leur tiers supérieur, ayant de 10 à 30 cm de long et terminés par une épine verdâtre quand ils sont à maturité ; le nombre de fleurs est très élevé 400 à 1 500 par épillet.

I-2 - L'inflorescence femelle

Morphologiquement le spadice femelle se distingue aisément du spadice mâle bien que toutes les pièces y soient homologues. Sur un axe très fibreux, renflé en rachis, s'insèrent pour un même individu un nombre d'épis sensiblement égal à celui du spadice mâle.

Les épillets femelles sont nettement moins longs que les mâles, plus trapus, souvent incurvés. Les bractées florales sont dures, piquantes et l'épillet lui-même se termine parfois en un long et fort ergot. Le nombre de fleurs par épillet varie de 5 à 30.

.../.

Les inflorescences que nous avons reçues provenaien de la Station de La Mé (Côte d'Ivoire) et nous étaient expédiées par avion. A leur arrivée, les inflorescences sont conservées dans une chambre froide à 6° C et nous observons cependant des brunissements très intenses des épis après deux ou trois jours de stockage. Ce moyen de conservation n'empêche donc pas la détérioration du matériel ; l'état physiologique des cellules est affecté et partant les propriétés biochimiques des mitochondries extraites de ce matériel risquent de l'être.

II - LES GRAINES

Le fruit de l'Elaeis est une drupe sessile ovoïde longue de 3 à 5 cm. Cette drupe renferme la graine proprement dite, constituée par un endocarpe, ou coque sclérifiée très dure, noire de 0,5 mm à 4-5 mm d'épaisseur et d'une amande à l'intérieur.

La graine porte trois pores germinatifs de 2-3 mm de diamètre, par l'un deux sortira l'embryon.

La graine est dormante, pour germer il est nécessaire de lui faire subir une période de chauffage (40° C) à une humidité déterminée.

Les graines que nous avons reçues étaient germées au stade point blanc (embryon apparent au pore germinatif) (photo 1) et provenaient de la Station de La Mé (Côte d'Ivoire)

Les génotypes reçus sont indiqués au tableau 1, ils correspondent à des hybrides et des autofécondations plantés sur la station de La Mé dans différents essais.

Les matériels étudiés sont les suivants :

- hybride simple LA ME x DELI
- hybride simple YANGAMBI x DELI
- autofécondations de quelques parents des hybrides simples ci-dessus.

Les hybrides La Mé x Deli et Yangambi x Deli sont effectués entre matériels non apparentés; La Mé correspond à une population d'origine ivoirienne, Yangambi cor-

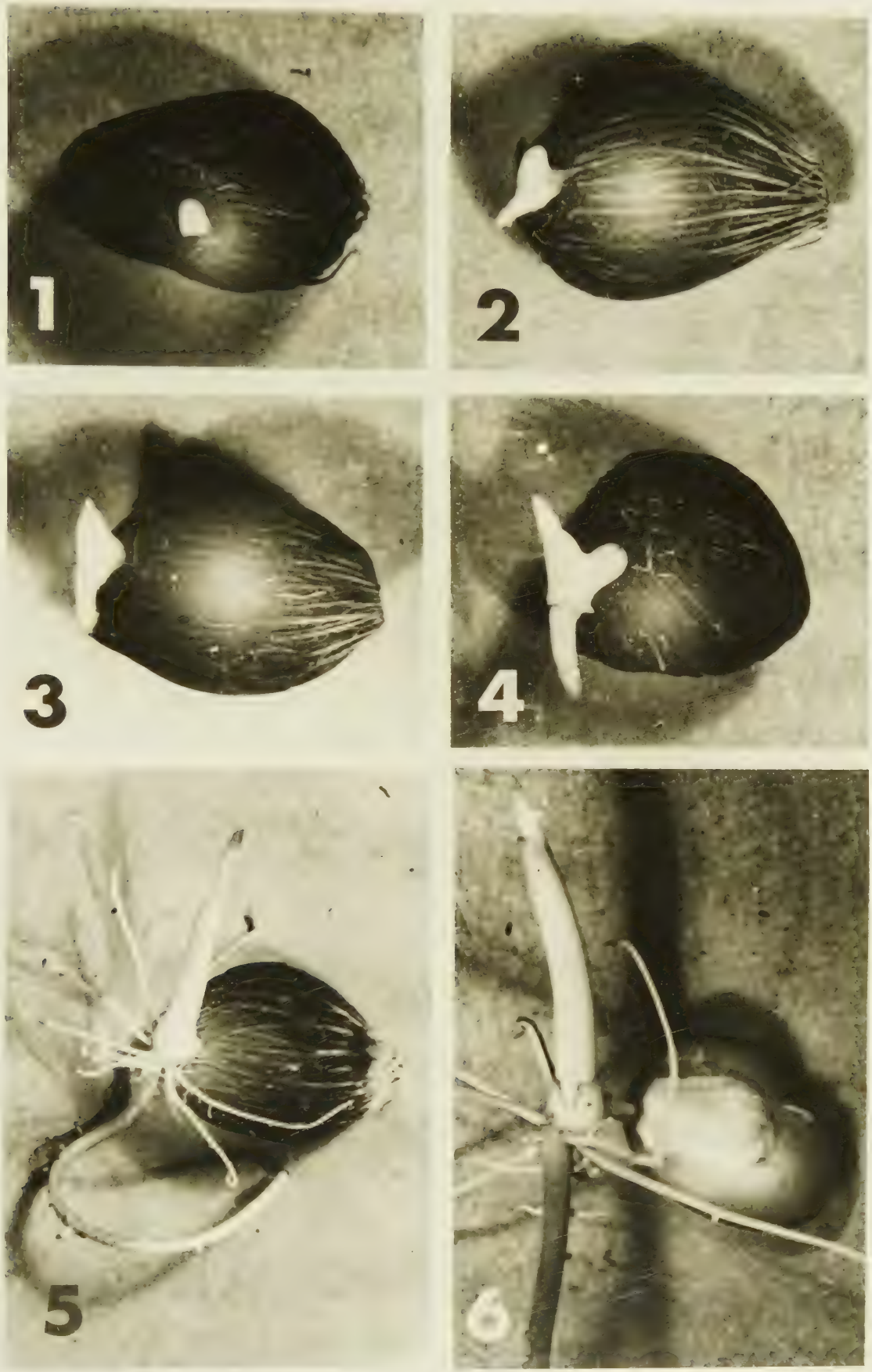
.../.

Tableau 1 : Liste des génotypes étudiés

n° d'ordre	N° de semis	Parents		Origine des parents		autofécondation étudiées des Parents
		femelle	mâle	parent femelle	parent mâle	
	1 - Hybrides La Mé × Deli					
H 1	1	L 7 T	D128D	BRT 10	DABOU	L 7 T, D 128 D
H 2	284	L 7 T	D 6D	BRT 10	DABOU	L 7 T
H 3	249	L 2 T	D 8D	BRT 10	DABOU	
H 4	251	L 9 T	D 8D	BRT 10	DABOU	L 9 T
H 5	250	L 14 T	D300D	BRT10 × TEIS3	DABOU	
H 6	281	L451T	L644D	LM 6	DA 89	L 644 D
H 7	299	L416D	L506P	SOC 3237	LM 8	L 416 D
	2 - Hybrides Yangambi × Deli					
H 8	2	L238T	D 10D	YA 69	DABOU	L 238 T
H 9	4 et 5	L238T	L270D(1)	YA 69	SOC 1386	L 238 T, L 270 D
H10	283	L426T	L564D	YA 3	DA 89	L 426 T
H11	248	L426T	L644D	YA 3	DA 89	L 426 T, L 644 D
H12	3	L430T	L644D	YA 3	DA 89	L 430 T, L 644 D
H13	247	L430T	L655D	YA 3	DA 89	L 430 T
H14	280	L431T	L414D	YA 3	SOC 3237	
H15	282	L412D	L431T	SOC 3237	YA 3	
	3 - Autofécondations des parents dura déli					
P 1	295	D128D	D128D	DABOU	DABOU	
P 2	293	L270D	L270D	SOC 1386	SOC 1386	
P 3	290	L416D	L416D	SOC 3237	SOC 3237	
P 4	291	L644D	L644D	DA 89	DA 89	
P 5	292	L655D	L655D	DA 89	DA 89	
	4 - Autofécondations des parents tenera La Mé					
P 6	288	L 7 T	L 7 T	BRT 10	BRT 10	
P 7	287	L 9 T	L 9 T	BRT 10	BRT 10	
	5 - Autofécondations des parents tenera Yangambi					
P 8	289	L238T	L238T	YA 69	YA 69	
P 9	285	L426T	L426T	YA 3	YA 3	
P10	286	L430T	L430T	YA 3	YA 3	

(1) Le croisement inverse (L 270 D × L 238 T) a été également étudié.

Photo 1 : Graines germées



respond à des arbres provenant du Zaïre et Deli à des arbres provenant d'une population bien différenciée introduite en Extrême-Orient au milieu du 19ème siècle.

Pour leur expédition, les graines sont conditionnées dans des sacs en plastique hermétiquement fermés et placés dans des boites isothermes avec de la perlite. Elles arrivent trois jours après l'expédition et sont placées, dans leurs sacs, dans une étuve thermostatée à 27° pendant environ deux semaines. Les germes atteignent alors 2 à 3 cm de longueur (Photo 1-5). C'est ce stade que nous avons utilisé pour les études mitochondriales. L'état physiologique de ce matériel était excellent.

III - LES RACINES

Les racines ayant servi à notre étude provenaient soit de graines germées, soit d'arbres adultes de la Station de La Mé. Dans ce dernier cas, seule la partie terminale blanche est utilisée.

La technique de prélèvement de racines jeunes sur arbres en plantation a été mise au point pendant un séjour de deux mois effectué sur la Station de La Mé (juillet-septembre 1975) elle est la suivante :

- creuser à partir d'1 m à 1 m 50 du stipe d'un arbre pour suivre une ou plusieurs racines de l'arbre et non celles d'un arbre voisin.

- creuser à environ 25 à 30 cm de profondeur.

- suivre 1 racine principale jusqu'à son extrémité, en général l'évolution de la racine est la suivante : elle est noire à la partie la plus vieille, puis devient rouge-marron.

- creuser alors soigneusement en faisant attention à ne pas blesser la racine.

- prélever 10 à 15 cm de la partie blanche, comprenant l'apex. Le prélèvement est fait suffisamment long pour préserver l'intégrité de l'apex.

- une fois prélevée, la racine est immédiatement mise dans un seau contenant de l'eau propre.

.../.

Photo 2 : Conditionnement des racines prélevées sur arbres adultes

- regrouper les racines prélevées sur un arbre à l'aide d'un élastique .

- au laboratoire les racines sont lavées soigneusement à l'eau courante puis à l'eau distillée plusieurs fois (2 à 3 fois) et mises humides dans des sacs en plastique. (photo 2)

- les sacs sont ensuite fermés hermétiquement avec des élastiques et repérés par un numéro.

- Pour l'expédition, les sacs sont placés dans une glacière contentant de la glace ; Cet emballage maintient une température d'environ 4°C.

REMARQUES

Les matériels reçus, (inflorescences, graines germées, racines) d'origines génétiques diverses, ont des états physiologiques qui dépendent des conditions de transport ; la nature des perturbations internes de ces matériels nous est inconnue.

I - ISOLEMENT DES MITOCHONDRIES

I-1 - Sur inflorescences

I-1-1 - Milieux de broyage

Différents milieux ont été essayés en particulier ceux de LANCE et al. (1965), SARKISSIAN (1970), WISKICH et BONNER (1963) HANSAN Ku et Al (1968). LANCE et MOREAU (1972), MAZLIAK et KADER (1972).

La composition de ces milieux est indiquée au tableau 2. Seul, le milieu de MAZLIAK et KADER nous a donné des résultats interessants (amélioration de la phosphorylation). Ce milieu a une force ionique supérieure à celle des autres milieux utilisés, une pression osmotique également supérieure et un pH au départ de 8 à 8,5 contre 7,5 pour les autres.

I-1-2 - Protocole d'isolement

20 gr d'épillets refroidis dans de la glace pilée sont réduits en petits morceaux et broyés dans un mortier en présence de sable fin de Fontainebleau et de milieu de broyage. Le mortier est posé sur de la glace pilée pendant toute l'opération.

Le rapport poids de matière fraîche / volume de milieu de broyage est d'environ 1/5 ; le temps de broyage est d'1 minute.

Le milieu de broyage a la composition indiquée dans le tableau 2, MAZLIAK (1972).

L'homogénat obtenu est filtré sur une toile de nylon à maille de 50 μ. Le filtrat est ensuite centrifugé dans une centrifugeuse réfrigérée Sorvall modèle RC 2 B avec rotor SS 34 à 3800 tour/mn pendant 10 à 15 mn. Le surnageant récupéré est centrifugé à 9100 tours/mn (10000 g) pendant 15 mn. Le culot est récupéré dans un milieu de lavage ayant la composition suivante : MAZLIAK et KADER, (1972) 0,4 M saccharose, 10 mM KCL, 0,1 M Tris, pH : 7,5 et 0,1 % BSA.

La suspension est centrifugée à son tour à 7000 T/mn (6000 g) pendant 15 minutes en utilisant le rotor modèle SS 34. Le culot obtenu est récupéré dans 0,5 ml de milieu culot MAZLIAK et KADER (1972) contenant : 0,25 M saccharose, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EDTA, 10 mM KH_2PO_4 et 10 mM Tris pH 7,5 avec BSA 0,1 %. Il faut noter que ces milieux ne conviennent pas toujours à tous les échantillons d'inflorescen-

.../.

Tableau 2 : Composition des milieux d'isolement testés sur inflorescences

Constituants des milieux	concentration des milieux				
	MAZLIAK et KADER 1972	Blé SARKISSIAN 1970	Maïs Mac DANIEL 1971	BONNER1963 LANCE 1972	Ku (1968)
Manitol				0,3 M	
Sucrose	0,4 M	0,5 M	0,4 M		0,4 M
TA(1) ou EGTA(2)	10 mM (1)	1 mM (1)	5 mM (2)	1 mM (1)	8 mM (1)
Mg C12	1 mM				2 mM
KC1	10 mM				10 mM
KH2PO4		67 mM	50 mM		
TRIS	100 mM				50 mM
CYSTEINE	4 mM			4 mM	4 mM
BSA	1 g/1	0,75 g/1	1 g/1	1 g/1	0,5 g/1
P H	8 à 8,5 avec TRIS M	7,2 avec KOH ou TRIS M	7,6 avec TRIS M	7,2 avec KOH N	7,6 avec KOH N

(1) EDTA ACIDE ETHYLENE DIAMINOTETRAACETIQUE (sel disodique)

(2) EGTA ACIDE ETHYLENE GLYCOLTETRAACETIQUE

- Troisième partie -

LES METHODES EXPERIMENTALES

ces que nous avons traités, ce qui suppose qu'un milieu spécifique à l'inflorescence de palmier reste à déterminer.

I-2 - Les germes et les racines

I-2-1 - Milieux de broyage.

L'étude des mitochondries des germes et des racines a nécessité au préalable, la mise au point de milieux de broyage et de réaction.

En effet, tous les milieux testés sur inflorescences ont été essayés sur germes et racines, mais les mitochondries isolées n'ont pas présenté de couplage. Nous avons donc fait une sorte d'échiquier qui nous a permis de tester certaines combinaisons des composants du milieu de départ. (tableau 3)

Nous sommes partis d'un milieu de base dont les compositions en éléments sont celles de MAZLIAK (1972) et dont les variations ont porté sur :

- la pression osmotique, essentiellement due à la concentration en sucre
- la concentration du chélateur ou compléxateur (EDTA Na2)
- la concentration des tampons KH_2PO_4 et Tris
- la force ionique qui a été diminuée par suppression de certains composés ($MgCl_2$, KCl)
- l'adjonction de polyvinyl-pyrolidone au milieu de broyage.

Le milieu qui permet d'obtenir des mitochondries isolées de germes et de racines, ayant une activité relativement bonne est le suivant :

Saccharose	0,25 M
EDTA	5 mM
KH_2PO_4	50 mM
Tris	50 mM
cystéine	0,05 %
PVP	0,5 %
BSA	0,1 %

Le pH est ajusté à 7,5 avec KOH,2N

Ce milieu ressemble à celui établi par ROUMANI (1969) en ce qui concerne la pression osmotique et la force ionique.

.../.

Saccharose	0,5 M		0,4 M		0,35 M		0,25 M	
(E.D.T.A.) Na2	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM
KH2 PO4	100 mM	50 mM	100 mM	50 mM	100 mM	50 mM	100 mM	50 mM
Tris	100 mM	50 mM	100 mM	50 mM	100 mM	50 mM	100 mM	50 mM
cystéïne	0,05 %	0,05 %	0,05%	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %
B.S.A.	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
P.V.P.	± 0,5 %	± 0,5 %	± 0,5 %	± 0,5 %	± 0,5 %	± 0,5 %	± 0,5 %	± 0,5 %
P.H	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5

Tableau 3 : Composition des différents milieux testés

I-2-2 - Protocole d'isolement

I-2-2-1 - Introduction

Les isolements peuvent être faits en utilisant une centrifugation lente ou une centrifugation rapide. La centrifugation lente est une méthode moins brutale, mais, étant longue les mitochondries ont vieilli et sont moins actives en fin d'isolement.

Pour la centrifugation rapide, il faut trouver l'équilibre entre le temps et la vitesse de centrifugation de façon à obtenir des mitochondries en bon état.

Nous avons choisi la centrifugation rapide d'une part, afin de pouvoir faire un grand nombre d'isolements par jour et donc de comparer différents milieux (PALMER, 1967, SARKISSIAN et SRIVASTAVA, 1968) et d'autre part parce que les activités des mitochondries isolées par cette centrifugation sont meilleures, MALHOTRA et al. (1971), PALMER (1967).

Les opérations d'extractions ou d'isolement sont toujours conduites entre 0 et 4°C pour diminuer au maximum la destruction de la structure native des molécules ou des particules recherchées et en particulier l'hydrolyse de leurs membranes par les enzymes protéolitiques présents dans la plupart des cellules ; à cette température, les activités de certaines enzymes sont atténuées.

I-2-2-2 - Mode opératoire

10 à 20 g de germes ou de racines sont plongés dans un milieu de broyage refroidi. Ces germes ou racines sont découpés en petits morceaux et mis directement dans un mortier en présence de sable de Fontainebleau et de 5 ml de milieu de broyage précédemment décrit.

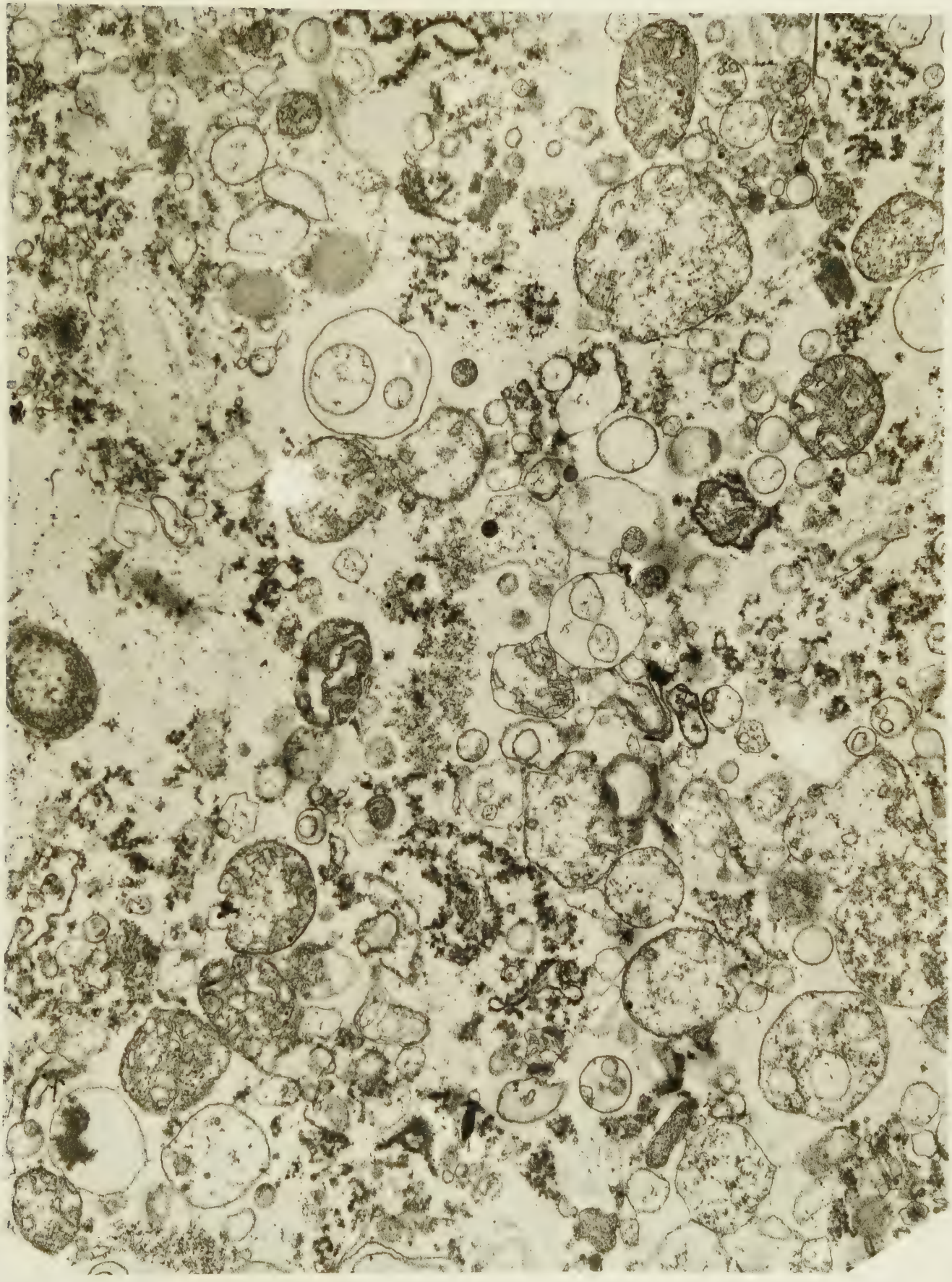
Ils sont ensuite broyés énergiquement et rapidement en ajoutant progressivement 30 ml de milieu de broyage pour 10 g de matière fraîche.

Le rapport poids de matière fraîche/volume de milieu de broyage est de 1/3 (ROUMANI, 1969). Le pH final de l'homogénat en fin de broyage est de 7,2 à 7,3. L'homogénat est filtré sur une toile de nylon à maille de 50 µ pliée en deux, puis le filtrat est centrifugé à 9000 g (9100 T/mn) pendant 15 secondes ; le culot est éliminé et le surnageant est changé de tube puis centrifugé à 18000 T/mn pendant 2 mn.

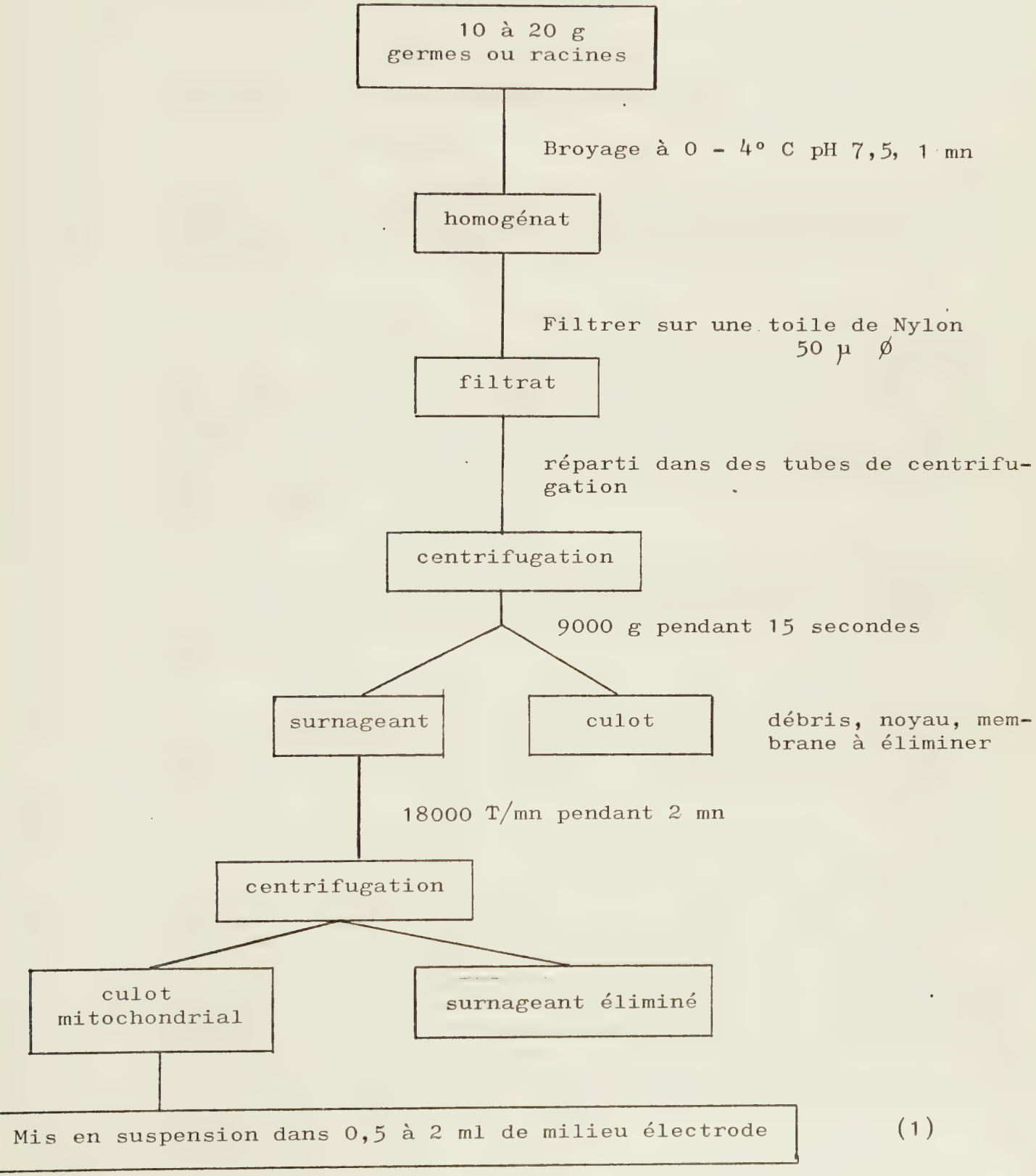
Le culot renfermant les mitochondries est mis en

.../.

Photo 3 : Mitochondries de racines de palmier à huile (× 30 000)



suspension dans 0,5 à 2 ml de milieu électrode ou réactionnel. Le schéma de l'isolement est le suivant :



(1) Ces proportions dépendent du matériel. 20 g de germes ou de racines de graines germées sont repris dans 2 ml de milieu réactionnel alors que 10 g de racines issues d'arbres sont repris dans 0,5 ml de milieu électrode.

I-3 - Rôle des constituants des milieux

I-3-1 - Saccharose

Le saccharose à la concentrationutilisée se rapproche certainement de la pression osmotique interne des mitochondries. L'isotonicité du milieu d'extraction et du milieu réactionnel est maintenue grâce au saccharose.

I-3-2 - L'EDTA

L'EDTA est un agent de chélation des ions divalents tels que Mg^{++}, Ca^{++} vacuolaires qui sont libérés lors du broyage des tissus. Ces ions peuvent avoir un effet néfaste sur la structure moléculaire et membranaire des mitochondries si leurs concentrations sont trop élevées. D'autre part les ions monovalents à trop forte concentration peuvent découpler la phosphorylation oxydative des mitochondries (MEYER et al., 1971).

Ces ions monovalents ou divalents jouent cependant un rôle dans l'intégrité biochimique des mitochondries d'où leur utilisation dans les milieux réactionnels. Ce sont des cofacteurs de certains enzymes tel que l'ATPase qui a besoin de Mg^{++}.

Certains milieux d'extraction ont également besoin de MgCl2 pour maintenir l'activité phosphorylante des mitochondries : CHAPPEL et al. (1954), ERNSTER et al (1967), HOBSON et al (1966), LANCE et al. (1965), WISKICH (1967), WISKICH et al. (1964).

I-3-3 - Le tampon

L'acidité élevée des vacuoles des cellules des végétaux supérieurs nécessite un contrôle strict du pH pendant le broyage, IKUMA (1970). L'utilisation des composés à pouvoir tampon élevé évite quelquefois cette manipulation fastidieuse. Nous avons utilisé l'action conjuguée de deux tampons : le tris-HCl et KH_2PO_4 ; l'un est basique et l'autre est acide. Il a été constaté qu'à concentration équimoléculaire, les deux composés ensemble ont un pouvoir tampon relativement élevé ; en partant d'un pH de 7,5, on obtient un pH final de 7,3 à 7,2 après broyage des germes ou des racines.

.../.

I-3-4 - Le pH

Le pH du milieu d'extraction a été considéré comme étant un facteur extrêmement critique, BONNER (1967), WISKICH et al. (1963). En général, un pH compris entre 7 et 7,5 apparaît préférable pour l'extraction des mitochondries des végétaux. Dans nos essais, nous avons maintenu le pH=7,5 au départ car c'est à ce pH que nous avons pu obtenir des activités phosphorylantes des mitochondries isolées de palmier.

I-3-5 - La cystéine

La cystéine est un acide aminé ayant un groupement SH dans sa molécule. C'est un réducteur des composés flaviniques, quinoniques et phénoliques.

Les polyphénoloxydases et composés phénoliques libérés lors du broyage ont un effet découplant voire néfaste sur l'activité des mitochondries. L'utilisation de la cystéine à la concentration de 0,05 % dans le milieu de broyage supprime en partie cet effet. Cependant la cystéine est autooxydable et le produit oxydé est nocif, HULME et al. (1964), VERLEUR (1965). Il convient donc de l'utiliser à faible concentration.

I-3-6 - Le PVP

Nous avons utilisé le polyvinylpyrolidone à poids moléculaire 40000 ; son rôle est d'adsorber les composés phénoliques libérés lors du broyage des cellules végétales ; nous avons utilisé la concentration de 0,5 % dans le milieu de broyage. Cette concentration a été préconisée par ROUMANI et al. (1969).

I-3-7 - Le serum albumine bovine (BSA), fraction V

Le sérum albumine bovine (ou bovin serum albumen ou BSA) est une protéine inactive enzymatiquement mais on lui attribue le pouvoir de se coller aux membranes des mitochondries et de les protéger : la concentration utilisée est de 0,1 %.

I-3-8 - Thiamine Pyrophosphate ou cocarboxylase

C'est un coenzyme de la décarboxylation oxydative des acides α cétoniques tels que l'α cetoglutarate. Pour suppléer le déficit éventuel en thiamine dans les extraits mitochondriaux, on l'ajoute au milieu réactionnel. Les concentrations utilisées sont en général très variables,

.../.

ROUMANI (1969), Mc DANIEL (1969), MALHOTRA et al. (1971).

Elle n'est pas nécessaire pour les mitochondries de certains végétaux tel que le blé. Nous avons utilisé la concentration de 0,25 mg/ml dans notre milieu réactionnel.

II - MESURE DES ACTIVITES MITOCHONDRIALES PAR POLAROGRAPHIE

Les mitochondries isolées sont mises dans un milieu réactionnel isotonique ; leur respiration liée à la phosphorylation oxydative est suivie par polarographie, en vue de déterminer les différents paramètres biochimiques définis par CHANCE et WILLIAMS (1955).

II-1 - Milieu électrode ou réactionnel

Le milieu électrode de base est celui de MAZLIAK (1972) auquel nous avons apporté les modifications suivantes :

- l'EDTA Na2 a été supprimé
- addition de 10 mM de KCl
- addition de cocarboxylase (TPP) à raison de 0,25 mg/ml
- le pH est de 7,2 au lieu de 7,5

La composition de ce milieu électrode modifié est donc la suivante :

Saccharose	0,25 M
$MgCl_2$	5 mM
KCl	10 mM
KH_2PO_4	10 mM
Tris	10 mM
TPP	0,25 mg/ml
BSA	1 g/l
pH	7,2 ajusté avec KOH, 2N

Ce milieu ressemble à celui de SARKISSIAN et SRIVASTAVA (1970) utilisé pour les mitochondries de maïs ; la seule différence étant la concentration en TPP (0,25 au lieu de 1 mg/ml). Le milieu de broyage précédemment décrit et le milieu électrode nous permettent d'obtenir des mitochondries couplées et présentant une assez bonne intégrité.

.../.

II-2 - Préparation des solutions de substrats d'oxydation

Les substrats d'oxydation suivants ont été utilisés :

Substrats d'oxydation	solution mère	prise pour 3 ml de milieu réactionnel	concentration finale dans la cuve réactionnelle (3 ml)
α cetoglutarate	750 mM	40 µl	10 mM
Malate	300 mM 3 M	100 µl 10 µl	10 mM 30 mM
succinate	375 mM	100 µl	10 mM
Malonate	375 mM	40 µl	10 mM
NADH	45 mM	100 µl	1[illegible] mM
ADP	75 mM	2, 3 ou 4 µl = NADH, malate, KGA 2µl = succinate	50, 75 ou 100 µM

Les composés sont en général sous forme de sels sodiques, il faut donc au préalable déterminer leur concentration. Les concentrations couramment utilisées se rencontrent dans la littérature relative aux activités phosphorylantes des mitochondries. Il est cependant très important de neutraliser les solutions préparées avant leur utilisation, (pH voisin de 7) car les électrodes et les mitochondries sont sensibles aux variations de pH. Les concentrations en général utilisées sont :

10 mM pour α cetoglutarate
30 mM Malate
1,5 mM NADH
10 mM Succinate
10 mM Malonate
} dans la cuve réactionnelle

.../.

II-3 - Technique de mesure de la phosphorylation oxydative

II-3-1 - Principe de la méthode polarographique

DAVIES (1962) a rassemblé et étudié les bases théoriques de la méthode polarographique et les a appliquées à l'utilisation de la cathode à oxygène. Cette électrode à oxygène du type électrode de Clark est constituée essentiellement d'une cathode de platine et d'une anode de référence plongeant dans un milieu d'électrolyse constitué par une solution de KCl demi-saturée.

Cet ensemble est séparé du milieu d'incubation saturé d'oxygène par une fine membrane de polyéthylène.

Lorsque l'on crée une tension de polarisation de 0,8 V entre ces deux électrodes, l'oxygène subit une réduction électrolytique à la surface du platine (cathode) ; l'intensité du courant d'électrolyse ainsi produit est proportionnelle à la concentration en oxygène dans la solution à une température donnée.

CHANCE et WILLIAMS (1955) ont appliqué cette méthode à l'étude de la respiration au niveau de la fraction mitochondriale.

L'oxygène dissous dans le milieu polarographique saturé peut être dosé par la méthode iodométrique de NICLOUX (1930) qui est une adaptation de la méthode mise au point par WINKLER (1901).

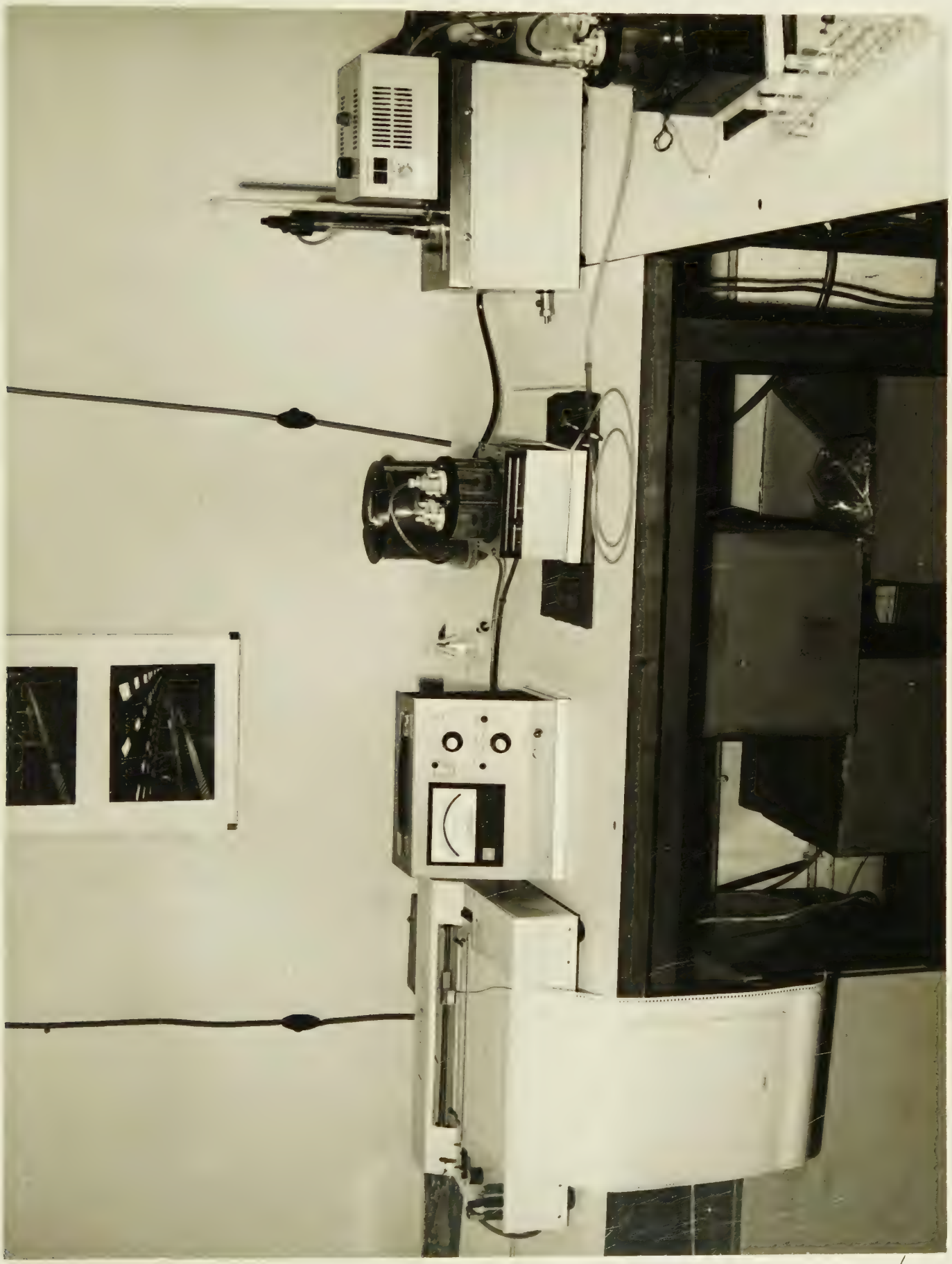
Pour notre part nous avons admis que la concentration en oxygène dans le milieu isotonique saturé d'air était de 240 µM, CHANCE et WILLIAMS (1955), (1956). Cette concentration a été déterminée à partir d'un abaque qui donne la concentration d'oxygène dans le milieu saturé d'air en fonction de la température, ESTABROOK (1967).

La consommation d'oxygène est mesurée à 27° C avec une électrode à oxygène du type Clark modèle B (Yellow Springs Instrument Company). Les réactifs sont introduits dans le milieu réactionnel à l'aide de microseringues par une fente taillée dans la sonde.

La sonde est reliée à un galvanomètre amplificateur qui donne directement le taux de saturation en oxygène du milieu. Ce galvanomètre est relié à un enregistreur type LINSEIS. (0 - 100 mV)

Les chambres réactionnelles sont plongées dans un bain-marie dont la température de 27° C est régulée par un modulateur, ce qui assure des variations inférieures au 1/100ème de degré C. (photo 3).

Photo 4 : Oxygraphe et accessoire
De gauche à droite : enregistreur, galvanomètre et modulateur de température.



.../.

Il est nécessaire de rappeler l'importance de la qualité de la membrane de la sonde polarographique car une détérioration même minime de cette membrane influe sur l'enregistrement parce que le courant de polarisation est parasité ; en effet, la membrane détériorée est perméable aux milieux réactionnels et les électrodes perdent leurs propriétés électrolytiques.

II-3-2 - Détermination des paramètres biochimiques mitochondriaux

Le comportement in vitro des mitochondries est suivi par la courbe de consommation d'oxygène. (Fig 1)
La quantité d'oxygène consommée est exprimée :

- soit en microatomes d'oxygène par minute et par mg de protéine ; dans ce cas, on a une activité spécifique respiratoire mitochondriale.

- soit en microatomes d'oxygène par minute ; dans ce cas, c'est une intensité de consommation (QO2)

II-3-2-1 - Le rapport ADP/O

Le rapport ADP/O est déterminé par la méthode de CHANCE et WILLIAMS (1955). Cette méthode permet d'apprécier l'efficacité du couplage de la respiration à la synthèse de l'ATP. La quantité d'oxygène utilisée au cours de cette phosphorylation est proportionnelle à la quantité d'ADP phosphorylée en ATP. Le rapport $\frac{ADP}{O}$ a été calculé à partir de la formule donnée par ESTABROOK (1967) : (voir figure 1)

$$\frac{ADP}{O} = (ADP) \times \frac{X}{Y}$$

- (ADP) est la quantité d'ADP ajoutée exprimée en micromoles ;

- X est la quantité totale d'oxygène contenue dans le milieu réactionnel, exprimée en microatomes ;

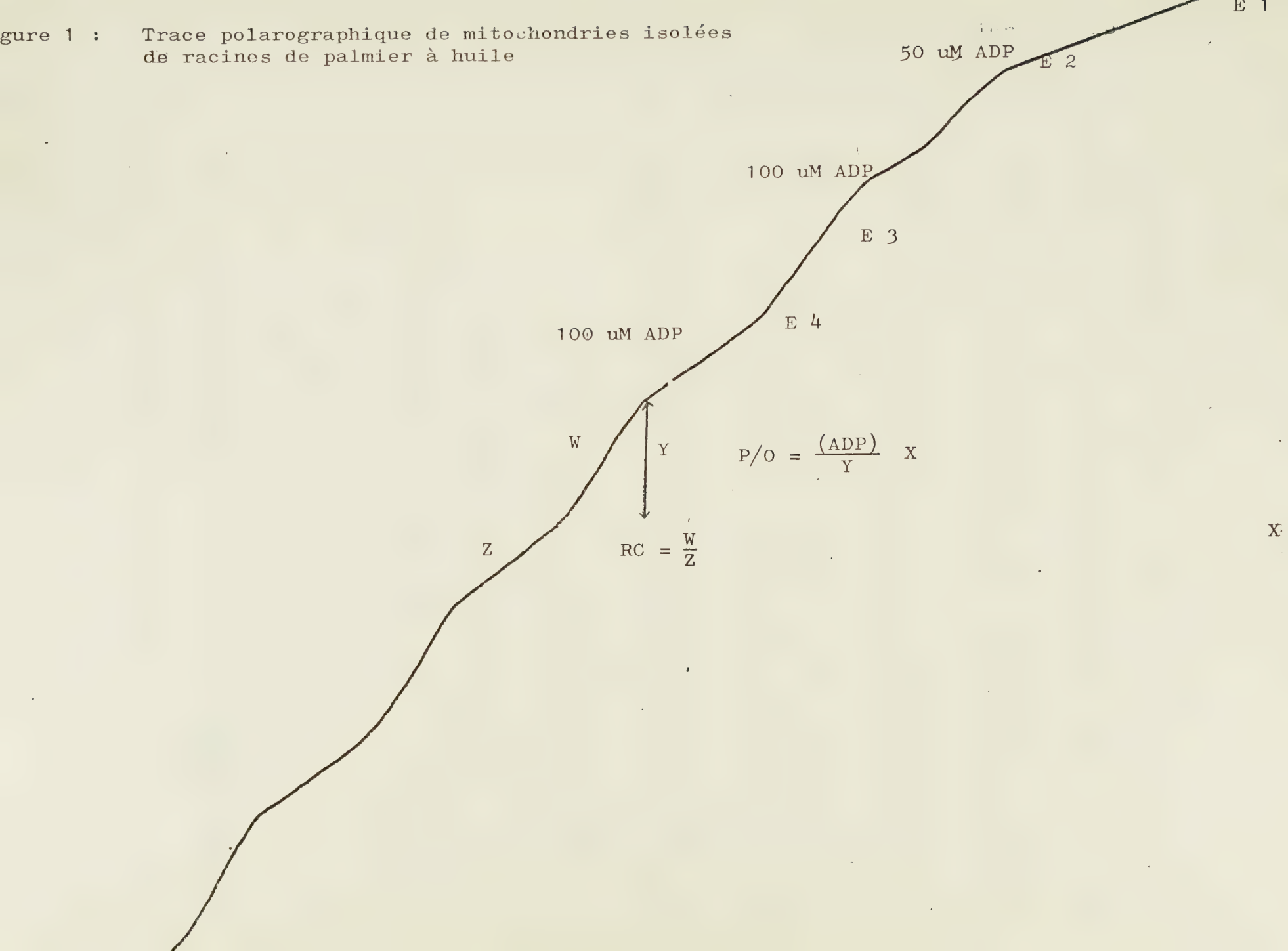
- Y est la quantité d'oxygène correspondant à l'utilisation de l'ADP au cours de l'Etat 3 qui sera défini plus loin.

II-3-2-2 - L'indice de contrôle respiratoire ou RC

Cet indice a été défini par CHANCE et WILLIAMS (1955) comme étant le rapport de la pente de la courbe correspondant à l'Etat 3 (W), sur la pente de la courbe correspondant à l'Etat 4 (Z) (voir fig. 1).

.../.

gure 1 : Trace polarographique de mitochondries isolées de racines de palmier à huile



Les caractéristiques des différents états d'une trace polarographique sont les suivants :

Etat 1 : correspond à une oxydation des substrats endogènes des mitochondries. Cette respiration est faible et reflète aussi l'extraction de ces mitochondries.

Etat 2 : on a une respiration plus accentuée due à l'apport du substrat à oxyder (KGA, NADH, Succinate, Malate etc...). L'ADP nécessaire à la phosphorylation est en quantité limitante.

Etat 3 : on a un excès de substrat et d'ADP. L'intensité de consommation d'oxygène est plus grande ; c'est à cette étape qu'a lieu la phosphorylation liée à l'oxydation.

Etat 4 : on a un excès de substrat à oxyder, mais la concentration en ADP devient limitante car l'ADP ajoutée est transformée en ATP, source d'énergie. La pente de l'Etat 4 est sensiblement la même que celle de l'Etat 2.

Le rapport $\frac{ADP}{O}$ est une mesure de l'efficacité des mitochondries dans un milieu donné ; le RC est un indice d'intégrité des mitochondries et mesure, en général, le couplage de l'oxydation à la phosphorylation.

II-3-2-3 - Calcul du rapport ADP/O et du RC

$$P/O = \frac{ADP}{O} = \frac{\text{Micromoles ADP ajoutées}}{\text{Microatomes d'oxygène utilisés}}$$

- Nombre de micro-moles d'ADP ajoutées

Soit X, le volume de la prise et C, la concentration molaire d'ADP (exprimée en micromoles)
Le nombre de micromoles d'ADP contenu dans la prise d'essai est :

$$\frac{(C) \times X \text{ (ml)}}{1000}$$

- Nombre de microatomes d'oxygène

Un milieu saturé contient environ 240 µM d'oxygène, CHANCE et WILLIAMS, donc pour 1 ml on a $\frac{240}{1000}$ micromole

soit X la consommation totale d'oxygène

.../.

soit Y la consommation d'O2 correspondant à l'utilisation de l'ADP (etat 3)
Le nombre de microatomes de O2 utilisé est :

$$\left(\frac{\text{Oxygène contenu dans le milieu}}{X}\right) \times Y \times (\text{volume réactionnel}) \times 2$$

Le RC est calculé en faisant le rapport des pentes des droites de consommation d'oxygène à l'état 3 et à l'état 4.

III - DOSAGES ENZYMATIQUES ET COLORIMETRIQUES

III-1 - Dosages enzymatiques

III-1-1 - Dosage de l'ADP, BERGMEYER(1974)

III-1-1-1 - Principe

La LDH catalyse la réduction du pyruvate.
L'ADP est déterminé en ajoutant dans la cuve réactionnelle du PEP. La réaction de phosphorylation oxydative est catalysée par le pyruvatekinase

1/ NAD^+ + lactate $\xleftarrow{LDH}$ pyruvate + NADH

2/ Phosphoenol pyruvate + ADP $\xrightarrow{PK}$ pyruvate + ATP

La diminution de la DO est due à l'oxydation du NADH2. Le NADH2 en excès permet de suivre la réaction de phosphorylation. Le pyruvate formé au cours de la réaction (2) est réduit dans la réaction (1). Comme la quantité d'ADP est stoechiométriquement égale à celle du pyruvate formé, la variation de DO mesurée correspond à la concentration d'ADP contenu dans la solution à doser.

III-1-1-2 - Mode opératoire

On ajoute successivement dans la cuve :

Tampon éthanolamine K2CO3 pH = 7,6 500 mM	2,00 ml
ADP (x)	0,1 à 1 µl
PEP (14 mM) (1)	150 ul
NADH (14 mM)	25 à 50 µl
LDH 5 mg/ml	20 ul
PK 10 mg/ml	20 ul

.../.

On établit la ligne de base avec la cuve contenant tous les réactifs sauf le pyruvatekinase puis, on ajoute ensuite le pyruvatekinase. La densité optique (DO) observée correspond à la concentration en ADP.

L'oxydoréduction du pyridine nucléotide est suivie en utilisant une longueur d'onde de 340 nm.

III-1-1-3 - Calcul

Nous utilisons la loi de Beer-Lambert

$\Delta DO = \mathcal{E}(C)\ L$ dans laquelle :

$\mathcal{E}_{340} = 6{,}22\ 10^{6}$ cm2 / mole

(C) est le nombre de moles par unité de volume

L est le trajet optique exprimé en cm

On en tire : $(C) = \frac{\Delta DO}{\mathcal{E} L}$

En tenant compte du volume de la prise d'essai et du volume final de la cuve, on obtient finalement :

$$(C) \text{ en moles} = \frac{\Delta DO}{\mathcal{E}} \times \frac{\text{Volume de la cuve}}{\text{Volume de la prise}}$$

Il suffit ensuite de multiplier par 1000 pour ramener en mole/litre.

III-1-2 - Dosage du cytochrome oxydase

III-1-2-1 - Principe

Le cytochrome oxydase (cytochrome C : O2 oxydo-réductase EC : 1-9-3-1) est l'enzyme terminale de la chaine respiratoire des mitochondries ; il est responsable de l'oxydation du cytochrome C, réduit par l'oxygène.

La réaction est la suivante :

$$\text{cytochrome C réduit} + O_2 + 4H^+ \xrightarrow[\text{oxydase}]{\text{cytochrome}} \text{cytochrome oxydé} + 2H_2O$$

ou $4\ C^{--} + O_2 + 4H^+ \xrightarrow[\text{oxydase}]{\text{cytochrome}} 4\ C^{---} + 2H_2O$

Cette oxydation est suivie spectrophotométriquement en exploitant l'absorption du cytochrome C à 550 nm.

III-1-2-2 - Mode opératoire

Les mitochondries sont isolées de racines d'un hybride et de ses deux parents par la méthode décrite dans la troisième partie ; 1 gramme de matière fraîche est utilisé. Le culot mitochondrial obtenu est repris avec 0,2 ml de tampon phosphate (KH_2PO_4 0,03 M) à pH = 7,4

Une partie de cette suspension (0,1 ml) est complétée à 0,2 ml avec du tampon phosphate, l'autre partie est complétée à 0,2 ml avec du triton 1 % dans du tampon.

Le triton est un détergent non ionique qui provoque le gonflement et l'éclatement des mitochondries et permet de libérer les enzymes.

Une solution mère de cytochrome C (10^{-4}M) dans du tampon phosphate 0,03M est réduite dans un erlenmeyer avec 1 à 2 gouttes de dithionite 1,2 M en secouant vigoureusement pendant environ 1 minute.

On a utilisé 5 µl de suspension mitochondriale, soit environ 50 µg de protéines. Et 100 à 1 000 µl de cytochrome C réduit 10^{-4}M. Le volume final dans la cuve est complété à 3 ml avec du tampon phosphate pH 7,4 à 0,03 M.

On établit alors la ligne de base avec la cuve contenant du cytochrome C pour lequel nous n'avons pas observé d'autoxydation notable. On ajoute ensuite 5 µl de protéines mitochondriales et on mélange rapidement puis l'on

.../.

suit l'oxydation à 550 nm au spectrophotomètre avec enregistreur. La vitesse d'oxydation du cytochrome C est linéaire pendant les deux premières minutes au moins.

III-2 - Dosages colorimètriques.

III-2-1 - Dosage des protéines

III-2-1-1 - Principe

Le dosage des protéines est effectué par la méthode LOWRY. Une solution de protéines en présence de réactif de Folin donne une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines. La densité optique de cette solution est mesurée à 750 nm.

III-2-1-2 - Réactifs

Solution I (solution alcaline de tartrate)

Tartrate de Na et K	0,5 g
Na_2CO_3	20 g
NaOH	0,1 N qsp 1 litre

Solution II

$CuSO_4$ 0,1 %	1 g/l

Solution III (solution alcaline de cuivre)

Solution I	45 ml	extemporanée
Solution II	5 ml	

Solution IV (Réactif de Folin Ciocalteu dans du phénol, référence Prolabo ou Merk).
Diluer au 1/4 le réactif de Folin dans de l'eau distillée ou de l'eau physiologique à 0,9 %.

III-2-1-3 - Mode opératoire

III-2-1-3-1 - Préparation de la gamme étalon

Une courbe étalon est tracée en utilisant une solution de BSA (Serum albumine bovine) fraction IV sigma à la concentration dans la solution mère de 10 mg/10 ml et une solution de NADH 0,1 N soit 1000 γ/ml. On fait une gamme de concentration allant de 25 γ/ml à 500 γ/ml dans des tubes de 5 ml.

.../.

Cette gamme est préparée de la façon suivante.:

25	prendre 25 µl	de solution mère,	ajouter 975 µl	d'eau distillée
50	" 50 µl	"	" 950 µl	"
100	" 100 µl	"	" 900 µl	"
150	" 150 µl	"	" 850 µl	"
200	" 200 µl	"	" 800 µl	"
300	" 300 µl	"	" 700 µl	"

etc...

On a toujours un volume final de 1 ml utilisé pour le dosage colorimètrique.

III-2-1-3-2 - Préparation de l'échantillon

Après quelques essais préalables de dilution des échantillons, on opère de la façon suivante :

- prélever 0,1 ml ou 0,2 ml de solution protéique à doser (milieu réactionnel contenant les mitochondries)
- compléter à 1 ml avec de l'eau distillée
- ajouter 0,1 ml d'acide perchlorique pour précipiter toutes les protéines ;
- ajouter 1 ml de Na OH 2N pour neutraliser l'acide perchlorique et dissoudre les protéines précipitées.
- prendre 0,5 ml de cette préparation pour le dosage colorimétrique.

III-2-1-3-3 - Dosage proprement dit

- prélever 0,5 ml de la solution protéique
- ajouter 4 ml de solution III
- faire 1 témoin avec 0,5 ml H20
- mélanger et laisser reposer 15 minutes
- ensuite ajouter rapidement dans les tubes 0,5 ml de réactif de Folin. Mélanger immédiatement et énergiquement.
- laisser reposer 30 minutes à l'obscurité. (la coloration obtenue est stable durant 7 h)
- lire à 750 nm. La courbe étalon permet d'avoir directement les quantités de protéines en γ/ml.

Le coefficient d'extraction des protéines mitochondriales chez les hybrides et les autofécondations a été de 6 %.

.../.

III-2-2 - Dosages des composés phénoliques

Compte tenu du fait que les tissus de palmier contiennent énormément de composés phénoliques, qui pourraient agir sur l'activité des mitochondries isolées, STOM (1971), nous avons entrepris de doser la quantité de phénol dans les germes et les inflorescences sous les conseils de Mr Rabéchault (ORSTOM Bondy). Ces dosages sont basés sur la méthode utilisée par TANGY (1970), pour doser le phénol des feuilles de tabac. Cette méthode donne de bons résultats avec les germes et les inflorescences de palmier à huile.

III-2-2-1 - Extraction des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont extraits au méthanol et sont ensuite dosés en présence du réactif de Folin, TANGY (1970) et MARIGO (1973).

III-2-2-1-1 - Principe

Les produits phénoliques sont extraits de matériel frais par le méthanol pur ; puis on reprend par l'eau et on débarasse la solution d'extraction des chlorophylles génantes pour le colorimètre à l'aide d'éther de pétrole qui ne dissout pas les phénols.

III-2-2-1-2 - Mode opératoire

La méthode employée pour les feuilles a été utilisée pour les germes et les inflorescences de palmier en supprimant l'étape concernant l'extraction des chlorophylles ; en effet les germes et les inflorescences ne contiennent pas de chlorophylle.

- un échantillon de germe ou d'inflorescence (1 g) est lavé rapidement à l'eau distillée pour le débarasser des produits indésirables (saleté etc...)

- après avoir été réssuyé au papier Joseph, l'échantillon est pesé et découpé en petits morceaux à l'aide de ciseaux.

- les morceaux sont placés dans un mortier et on ajoute une pincée de sable de Fontainebleau.

- après avoir versé un minimum de méthanol pur pour avoir une pâte, on broie au pilon le mieux possible pour avoir un mélange homogène.

.../.

- on verse la pâte obtenue dans un tube à centrifuger. Rincer le mortier avec du méthanol.

- après avoir remué avec un agitateur de verre, on centrifuge à 2500 T/mn pendant 3 minutes.

- on recueille le surnageant dans un ballon à distiller sous vide.

- on fait deux nouvelles extractions au méthanol sur le culot. Le temps de broyage et d'extraction est d'environ 20 mn.

- les surnageants sont réunis dans le ballon à distiller.

- l'extrait alcoolique est amené à sec à l'évaporateur (ROTAVAPOR)

III-2-2-1-3 - Préparation de l'extrait phénolique en vue du dosage

- amener le ballon à sec au Rotavapor.

- reprendre par l'eau le résidu en raclant avec un agitateur à Policeman ; après filtration, amener au volume voulu.

N.B. : Pour les petites quantités, on peut verser directement le volume désiré dans le ballon sec, homogénéiser avec le policeman et filtrer.

III-2-2-2 - Dosage des composés phénoliques

III-2-2-2-1 - Principe

Le dosage utilise la grande oxydabilité des substances phénoliques. Le réactif utilisé est un mélange de phosphomolybdate et de tungstate de sodium qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en milieu alcalin en un mélange de bleu de tungstène et de molybdate. La coloration produite (absorption maximale comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle aux taux de composés phénoliques ; la composition du réactif a été établie par Folin et Denis puis modifiée par Folin et Ciocalteu.

Cette méthode est également appliquée aux composés séparés et purifiés par chromatographie sur papier. Dans tous les cas, on compare à 1 gramme étalon préparé dans les mêmes conditions que le dosage proprement dit, ce qui necessite l'utilisation de produits de référence.

Pour l'estimation quantitative des phénols totaux la courbe standard est établie avec de l'acide chlorogénique.

/

III-2-2-2-2 - Dosage global des composés phénoliques

Cette méthode de dosage reposant sur le pouvoir réducteur des phénols a été proposée et utilisée par un grand nombre d'auteur comme PRO (1952) SMIT JOSLYN et LUKTON (1955) BRAY et THORPE (1952) SWANS et HILLIS (1959).

Le réactif de Folin et Ciocalteu a été utilisé pour le dosage.

III-2-2-2-3 - Les réactifs

Réactif de Folin et Ciocalteu

Un mélange contenant 100 g de tungstate de sodium ($Na_2WO_4\ 2H_2O$) 25 g de molybdate de sodium ($Na_2MoO_4\ 2H_2O$) 700 ml d'eau, 50 ml d'acide phosphorique à 85 % et 100 ml d'acide chlorydrique concentré, est mis à bouillir sous réfrigérant à reflux pendant 10 heures. Après ce délai, 150 g de sulfate de lithium, 50 ml H_2O et quelques gouttes de brome sont ajoutées. Le mélange est alors chauffé à 100° C de façon à éliminer l'excès de brome. La liqueur est alors mise à refroidir, diluée à un litre, puis filtrée. Elle est conservée au frigidaire dans une bouteille bien fermée. Pour notre part, nous avons utilisé le réactif de Folin commercial (MERK ou PROLABO).

Solution aqueuse de Na_2CO_3

Elle est faite en dissolvant 20 g de Na_2CO_3 dans 100 ml d'eau, concentration voisine de la saturation.

III-2-2-2-4 - Mode opératoire

Gamme d'échelon

Elle est constituée à partir d'une solution mère d'acide chlorogénique obtenue en dissolvant 100 mg d'acide chlorogénique dans le minimum de méthanol et en amenant à un litre avec H_2O. La concentration de la solution mère est de 100 γ /ml. On prépare la gamme dans des tubes de 25 ml, gradués, servant ensuite au dosage de la façon suivante, pour avoir un volume initial de 10 ml :

10 γ /ml	d'acide chlorogénique	servent de référence	au bilan	on ajoute	10 ml H_2O
2 γ /ml	"	on prend 0,5 ml	de solution mère	+ 9,5 ml	H_2O
4 γ /ml	"	" 1 ml	"	9 ml	"
6 γ /ml	"	" 1,5 ml	"	8,5 ml	"
8 γ /ml	"	" 2 ml	"	8 ml	"
10 γ /ml	"	" 2,5 ml	"	7,5 ml	"
12 γ /ml	"	" 3 ml	"	7 ml	"

etc... selon la concentration supposée des échantillons

.../.

Echantillon

Après quelques essais et dilution préalable des échantillons, on opère de la façon suivante.

1 / - prendre une aliquote convenable d'échantillon dans un tube gradué de 25 ml.

2 / - amener à 10 ml avec H20 et homogénéiser

3 / - ajouter 1 ml de réactif de Folin Ciocalteu

4 / - après 3 minutes (chronomètre) ajouter 2 ml de solution de Na2 C03 à 20 %

5 / - mettre les tubes ensemble dans un bain marie réglé à 40 - 45° et les laisser pendant 200 minutes.

6 / - amener au trait de jauge de 25 ml avec de l'eau. Homogénéiser

La lecture des déviations au spectrophotomètre sera faite environ une heure plus tard à 725 nm.

Remarques :

a/ L'écart de 3 minutes entre l'addition de réactif de Folin Ciocalteu et le carbonate de sodium ne semble pas impératif ; il peut être dépassé.

b/ L'utilisation d'un bain marie à 40 - 45° au lieu d'un bain marie bouillant présente l'avantage d'éviter une précipitation partielle, exigeant une filtration avant dosage.

Le temps de 20 mn est en outre plus commode pour la manipulation.

La coloration du bleu de molybdène reste stable pendant 2 à 3 heures avant de décroître.

Calcul

$$\frac{\gamma}{1\ ml} \times \frac{\text{Vol. total}}{\text{Vol. Prise}} \times \frac{\text{Vol. de la 2ème dilution}}{\text{Poids en gramme de l'échantillon}} \times \frac{100\ g}{10^6}$$

(on divise par 10^6 pour simplifier avec les γ)

.../.

- Quatrième Partie -

RESULTATS ET INTERPRETATION

I - RESULTATS ET INTERPRETATION SUR INFLORESCENCES

I-1 - Résultats (Tableaux 4 et 5)

Les essais sur inflorescences nous ont donné très peu de satisfaction parce que nous n'avons pas trouvé les milieux adéquats pour ce matériel et que les conditions de transport et de conservation du matériel provenant d'Afrique n'étaient pas bonnes.

L'exposé des résultats obtenus nous a cependant paru nécessaire si des travaux sont poursuivis sur ces organes.

I-2 - Interprétations

I-2-1 - Interprétation biologique

Les mitochondries isolées d'inflorescences :

1°/ consomment l'oxygène du milieu dans lequel elles sont placées. On constate cependant que cette vitesse de consommation à l'état 3 est relativement faible comparée à d'autres plantes telles que le blé, SARKISSIAN et SRIVASTAVA (1969) ou l'orge,Mc DANIEL (1973) ou le maïs étudié dans notre laboratoire.

2°/ Ne présentent pas de couplage ou bien ce couplage est très faible. Ce qui indique que la différence entre la vitesse de respiration stimulée par l'ADP (état 3) et celle due à l'oxydation simple du substrat d'oxydation (état 2 ou 4) est très petite. Le contrôle respiratoire est légèrement supérieur à 1, ce qui est très faible.

La phosphorylation oxydative caractérise l'efficacité des mitochondries et le contrôle respiratoire qui mesure le couplage, permet de se rendre compte de l'intégrité des mitochondries.

Les résultats obtenus peuvent s'expliquer par :

1°/ de mauvaises conditions d'extraction : les mitochondries auraient subi des altérations durant les opérations d'isolements (broyage, centrifugation en liaison avec les milieux utilisés : pH, pression osmotique, force ionique).

2°/ La présence de composés inhibiteurs d'enzymes mitochondriaux et en particulier de ceux de la chaine respiratoire. Nous avons pensé que les phénols pouvaient être en cause, mais leur dosage dans les inflorescences

.../.

Tableau 4 : Activités des mitochondries isolées d'inflorescences de palmier à huile. Substrat d'oxydation : succinate (10 mM) (moyennes de 6 répétitions)

énotypes	sexe de l'inflorescence	tampon	Activités mitochondriales								
			µ At O2 / mn / mg protéines		ADP/O cycles			RC cycles		
			Etat III	Etat IV	1	2	3	1	2	3
L644D	mâle	TRIS	1,12	0,91	0,41	0,79	0,86	1,22	1,19	1,39
26T × L644D (LM 993)	mâle	"	2,36	2,09	0,27	0,64	-	1,15	1,28	
26T × L644D	femelle	"	2,00	1,70	0,69	0,70	-	1,18	1,20	
30T × L644D	femelle	"	1,91	1,49	0,45	0,58	0,85	1,27	1,32	1,33
(LM 990)		TES	3,19	2,15	0,61	0,74	1,04	1,42	1,40	1,43

Tableau 5 : Activités des mitochondries isolées d'inflorescences de palmier à huile. Substrat d'oxydation : NADH (1,5 mM) (moyennes de 6 répétitions)

notypes	sexe de l'inflorescence	tampon	Activités mitochondriales								
			µ At O2 / mn / mg protéines		ADP/O cycles			RC cycles		
			Etat III	Etat IV	1	2	3	1	2	3
L644D	mâle	TRIS	0,66	0,55	0,40	0,59	-	1,21	1,33	-
LM 993	mâle	"	2,83	2,58	0,26	0,54	-	1,13	1,30	-
LM 993	femelle	"	1,66	1,53	0,27	-	-	1,15	-	-

et les germes, nous a permis de constater que le germe avait environ deux fois plus de phénols totaux que l'inflorescence (0,205 % pour le germe et 0,112 % pour l'inflorescence) ; la véritable cause du mauvais couplage au niveau des inflorescences n'est sans doute pas imputable aux phénols, puisque les germes nous ont toujours donné des mitochondries bien couplées (voir résultat sur germes et racines)

3°/ L'état physiologique des inflorescences après un transport est peut être différent et il est fortement probable que les inflorescences ont subi des chocs thermiques qui ont affecté leurs métabolismes, leur transport n'ayant pas été effectué en boites isothermes.

Les faibles valeurs trouvées (activité spécifique, ADP/O, RC) laissent penser que les mitochondries isolées de ces inflorescences perdent leur intégrité, d'où leur mauvais couplage. LANCE et al. (1975) ont étudié l'évolution des activités oxydatives et phosphorylantes des mitochondries d'ARUM maculatum L en fonction du développement de l'inflorescence et ont trouvé des ADP/O toujours très faibles ; l'efficacité de la phosphorylation oxydative diminue à mesure que l'on se rapproche de la crise respiratoire ; ce peut être le cas du palmier à huile.

I-2-2 - Interprétation physiologique des résultats

Les QO2, les rapports ADP/O et les contrôles respiratoires (RC) des mitochondries sont en rapport avec leur stucture moléculaire : les valeurs relativement faibles des paramètres déterminés laissent penser que les métabolismes enzymatiques sont peu efficaces.

La phosphorylation oxydative est du point de vue physiologique, l'aspect le plus important des oxydations cellulaires. Les systèmes biologiques dont les mitochondries, n'utilisent couramment que deux sources d'énergie chimique :

- un potentiel réducteur (sous forme, par exemple, de co-enzymes réduits comme dans la biosynthèse des acides gras.

- un potentiel de phosphorylation (sous forme principalement d'ATP). (figure 2)

Le fait que ces deux formes d'énergie soient inter-convertible est donc nécessaire à la coordination des métabolismes. Le couplage, et sa régulation sont assurés par l'association étroite, dans des structures subcellulaires définies, des enzymes d'oxydoréduction et de phosphorylation.

.../.

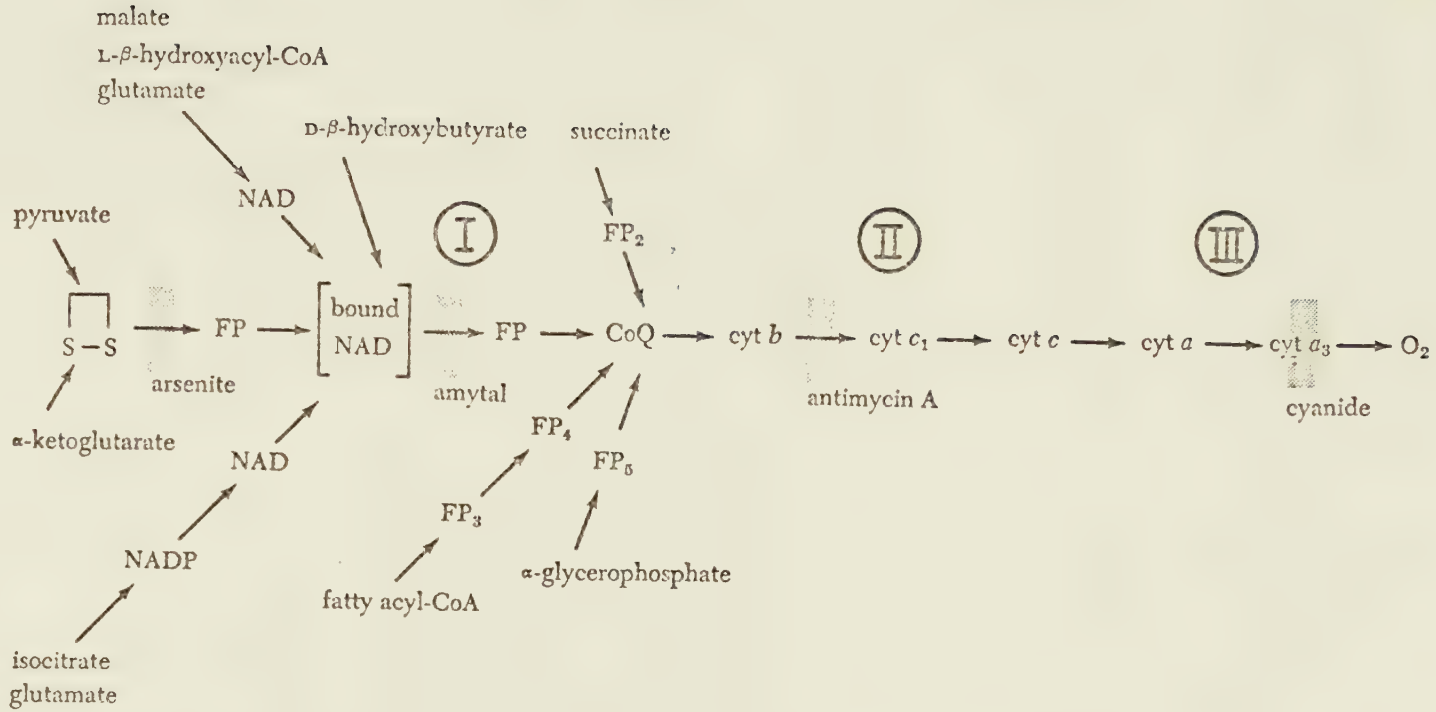


Figure 2 : Schéma de la chaine respiratoire
I, II et III sont les sites de phosphorylation
(d'après A.L. LEHNINGER, The Mitochondrion
W.A. Benjamin, Inc, 1964 page 60)

de leurs substrats et de leurs cofacteurs.

Ces considérations permettent d'émettre l'idée que les activités observées sont liées au mauvais fonctionnement enzymatique des mitochondries isolées d'inflorescences de palmier (ATPase et cytochrome oxydase). Compte tenu de ces résultats, nous avons décidé de faire une étude systématique du milieu de broyage et du milieu réactionnel pour déterminer les milieux spécifiques à l'inforescence de palmier à huile.

II - RESULTATS ET INTERPRETATIONS SUR GERMES ET RACINES DE GRAINES GERMEES

II-1 - Résultats

II-1-1 - Introduction

La liste des génotypes étudiés est donnée au tableau 1 et tous les génotypes sauf le semis n° 294, ont été testés. Le substrat d'oxydation a été le KGA, Le KGA + Malonate a été très peu utilisé. Il faut noter que lors des études, nous avons toujours obtenu plus de trois cycles de phosphorylation par échantillon, mais que le nombre de répétitions n'a jamais été suffisant ; quelquefois, nous avons eu une seule mesure pour un matériel donné ce qui nous a conduit à faire un certain nombre de tests pour savoir si les différents cycles de phosphorylation étaient identiques ou pas. Les valeurs ADP/O et RC étant non gaussiennes, nous avons utilisé les tests non paramètriques de KRUSKAL et WALLIS et DE KOLMOGOROV-SMIRNOV.

Dans le tableau ci-dessous, on a indiqué les ADP/O des trois cycles de quatre répétitions obtenues sur germes de graines germées de l'hybride L431T × L412D

	ADP/O 1er cycle	ADP/O 2ème cycle	ADP/O 3ème cycle
4 répétitions	1.96	1.88	1.74
	1.86	1.86	1.49
	2.40	1.95	1.95
	1.72	1.60	1.49

.../.

génotypes	quantité de protéines pour 3 ml de milieu	Q02	activité spécifique	$\frac{ADP}{O}$	coefficient respiratoire RC	Hétérosis au niveau des différents paramètres p. 100			
						activité spécifique	$\frac{ADP}{O}$	R C	Protéines
I - Hybrides LA ME x DELI et Parents autofécondés									
L 7 T x D 128 D	9,73	270	27,7	1,85	1,35				
L 7 T AF	2,83	145	51	1,49	1,39	43	116	95	223
D 128 D AF	5,88	279	47,5	1,70	1,45				
L 7 T x D 6 D	6,93	261	37,6	1,82	1,50	72	122	107	245
L 7 T AF	2,83	145	51,2	1,49	1,39				
L 2 T x D 8 D	7,87	252	32	1,82	1,56				
L 9 T x D 8 D (1)	7,06	367	52	1,11	1,36	91	77	108	187
L 9 T AF	3,77	216	57	1,44	1,25				
L 14 T x D 300 D	6,80	364	53,6	1,49	1,37				
L 451 T x L 644 D	5,04	163	32,5	1,68	1,41	88	92	81	86
L 644 D AF	5,85	214	36,6	1,83	1,85				
L 416 D x L 506 P	9,76	524	53,7	1,75	1,64	107	150	126	220
L 416 D AF	4,43	222	50	1,16	1,30				
II - Hybrides YANGAMBI x DELI et Parents autofécondés									
L 238 T x D 10 D	7,87	318	40,40	1,88	1,31	157	160	105	86
L 238 T AF	8,19	210	25,60	1,17	1,24				
L 238 T x L 270 D	8,14	307	38	1,54	1,35	138	101	93	94
L 238 T AF	8,19	210	25,6	1,17	1,24				
L 270 D AF	9,13	260	28,5	1,88	1,67				
L 426 T x L 564 D	7,08	212	30	1,87	1,26	133	136	94	58
L 426 T AF	12,28	277	22,5	1,37	1,34				
L 426 T x L 644 D	7,77	292	37,60	1,82	1,81	129	114	114	86
L 426 T AF	12,28	277	22,5	1,37	1,34				
L 644 D AF	5,85	215	37	1,83	1,85				
L 430 T x L 644 D	9,13	324	35,5	1,70	1,52	112	95	90	113
L 430 T AF	7,64	202	26,4	1,75	1,52				
L 644 D AF	5,85	215	37	1,83	1,85				
L 431 T x L 414 D	9,45	327	34,5	1,89	1,77				
L 412 D x L 431 T	7,08	269	38	1,82	1,53				

Tableau 7 : Résultats sur racines de graines germées (substrat KGA 10 mM)

génotypes	quantité de protéines pour 3 ml de milieu réactionnel	Q02	activité spécifique	$\frac{ADP}{O}$	coefficient respiratoire RC	Hétérosis au niveau des différents paramètres			
						activité spécifique	$\frac{ADP}{O}$	R C	Protéines
I - Hybrides LA ME x DELI et Parents autofécondés									
L 7 T x D 128 D	8,82	264	29,9	2,43	1,81				
L 7 T AF	4,88	290	59,4	1,70	1,73	45	148	108	184
D 128 D AF	4,72	344	72,8	1,59	1,61				
L 7 T x D 6 D	10,26	213	21	1,74	1,87				
L 7 T AF	4,88	290	59,4	1,70	1,73	35	102	108	210
L 9 T x D 8 D	5,67	224	74	2,40	2,10				
L 9 T x D 8 D									
L 9 T AF	4,88	237,2	48,62	1,80	1,46				
L 14 T x D 300 D	5,67	326	57,5	1,21	1,36				
L 431 T x L 644 D	6,61	206	31,2	1,52	1,63				
L 644 D AF									
L 416 D x L 506 P	6,66	240	36	1,81	1,53				
L 416 D AF									
II - Hybrides YANGAMBI x DELI et parents autofécondés									
L 238 T x D 10 D	6,55	343	52,3	1,84	1,52				
L 238 T AF	4,72	260	55	1,21	1,33	95	152	114	138
L 238 T x L 270 D	6,06	362	59,7	2,18	1,79				
L 238 T AF	4,72	260	55	1,21	1,33	120	156	125	117
L 270 D AF	5,98	204	34	1,59	1,53				
L 430 T x L 644 D	6,55	334	51	2,01	1,92				
L 430 T AF	5,98	286	47,8	1,84	1,67	106	109	115	109
L 644 D AF									
L 430 T x L 655 D	10,08	150	15	1,98	1,53				
L 430 T AF	5,98	286	47,8	1,84	1,67	31	108	92	168
L 431 T x L 414 D									
L 412 D x L 431 T	8,03								

Le test de Kruskal et Wallis montre qu'il n'y a pas de différences entre les cycles. (χ^2 obs = 2,49 pour un χ^2 théorique = 7,81 pour 3 ddl) de même que le test de KOLMOGOROV-SMIRNOV.

II-1-2 - Présentation des résultats

Les tableaux 6 et 7 ainsi que les figures 3 et 4 comparent les hybrides à leurs parents. Nous avons fait une représentation graphique à une dimension des différents paramètres en les classant chacun par ordre décroissant des valeurs observées.

L'hétérosis a été exprimé en pourcentage en utilisant la formule suivante :

$$\text{Hétérosis} = \frac{F1}{(P1 + P2)/2} \times 100$$

Le seuil étant évidemment de 100. Lorsque nous n'avions que le résultat d'un parent, nous avons calculé le pourcentage d'hétérosis par rapport à ce parent.

II-2 - Interprétation

II-2-1 - Interprétation biologique

II-2-1-1 - Le QO2 et les activités spécifiques respiratoires

Sur la figure 3 où chaque point correspond à un génotype et où nous avons classé les génotypes par ordre décroissant des valeurs obtenues pour leurs activités mitochondriales, on constate que les courbes correspondant aux hybrides se situent en général au dessus de celle correspondant aux parents ; ce résultat est particulièrement net sur germes.

Cette représentation présente le double inconvénient de ne pas faire correspondre l'hybride à ses parents à une même abscisse et de ne pas retrouver les génotypes dans le même ordre d'une figure à l'autre. Elle permet cependant de bien se rendre compte de la situation d'ensemble des hybrides et des parents étudiés.

Les activités spécifiques respiratoires ne varient pas toujours dans le même sens que le QO2 parce que les quantités de protéines extraites varient d'un génotype à l'autre pour un même poids de matière fraîche.

Sur les figures 5 où les résultats ont été représentés de façon à faire correspondre l'hybride à ses parents.

.../.

Figure 3 : PARAMETRES CLASSES PAR VALEURS DECROISSANTES

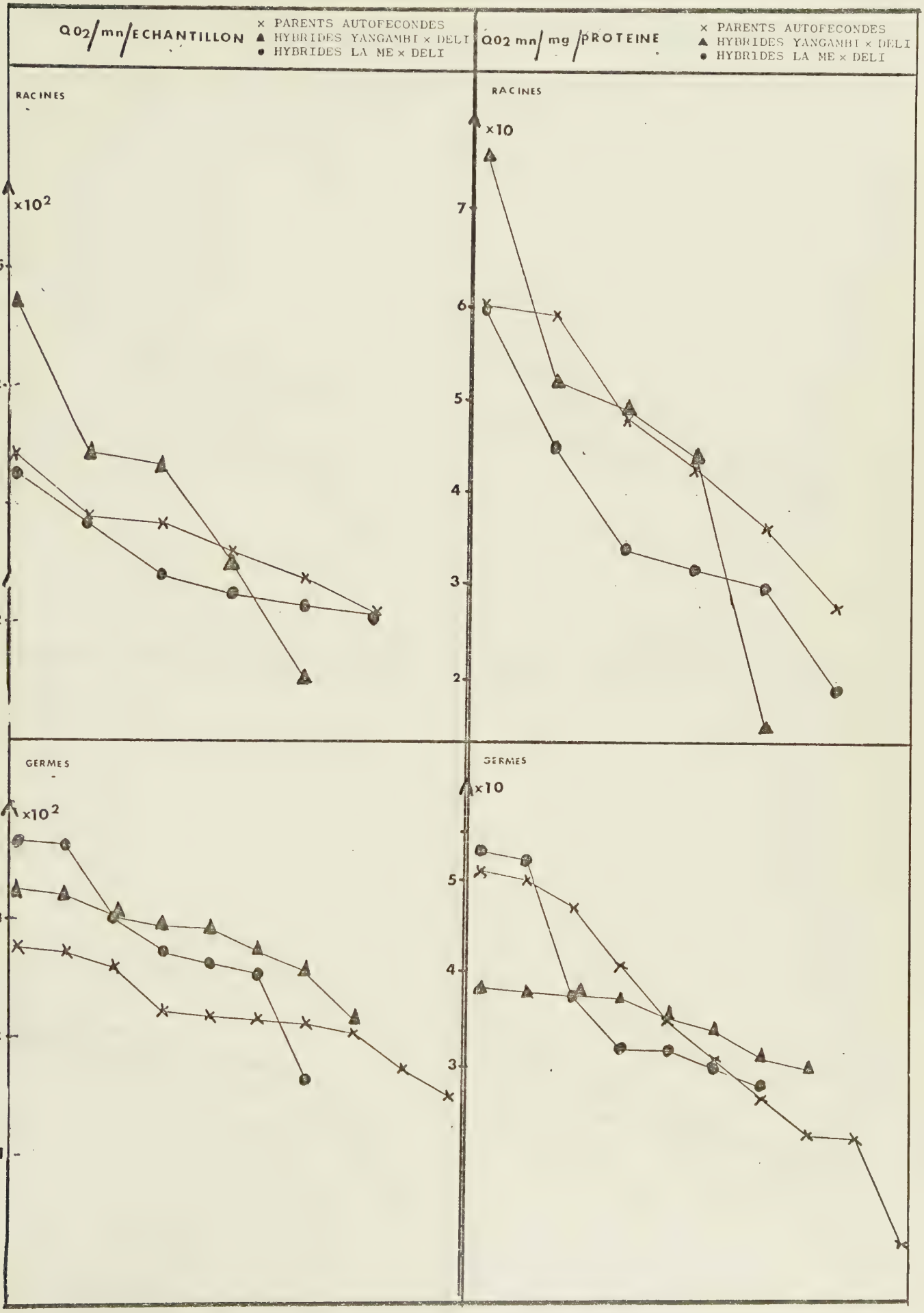


Figure 4 : PARAMETRES CLASSES PAR VALEURS DECROISSANTES

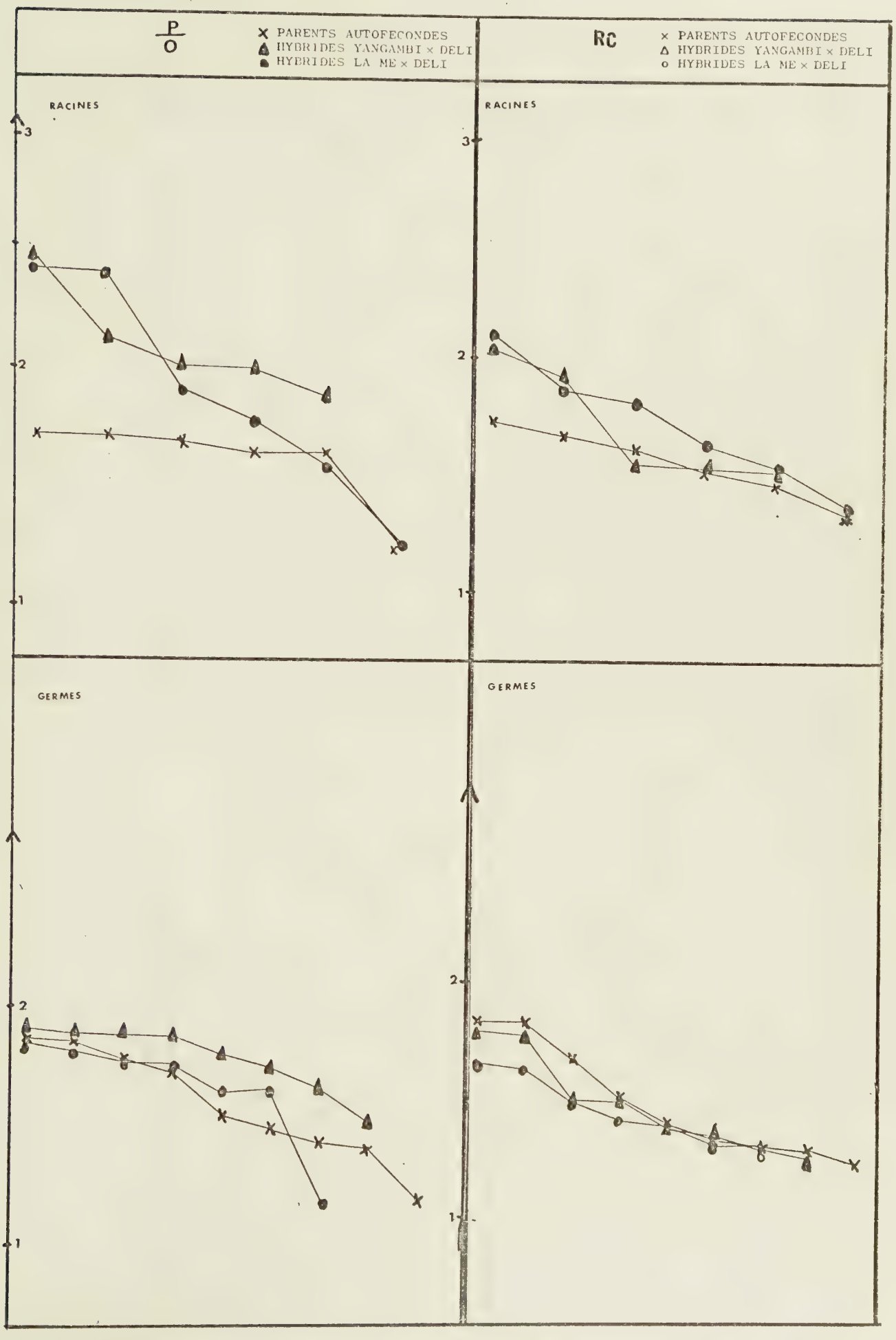


Figure 5a : Comparaison d'hybrides et des parents
Q02 et activités spécifiques respiratoires
A : hybrides La Mé × Deli P : parent
B : hybrides Yangambi × Deli H : hybride

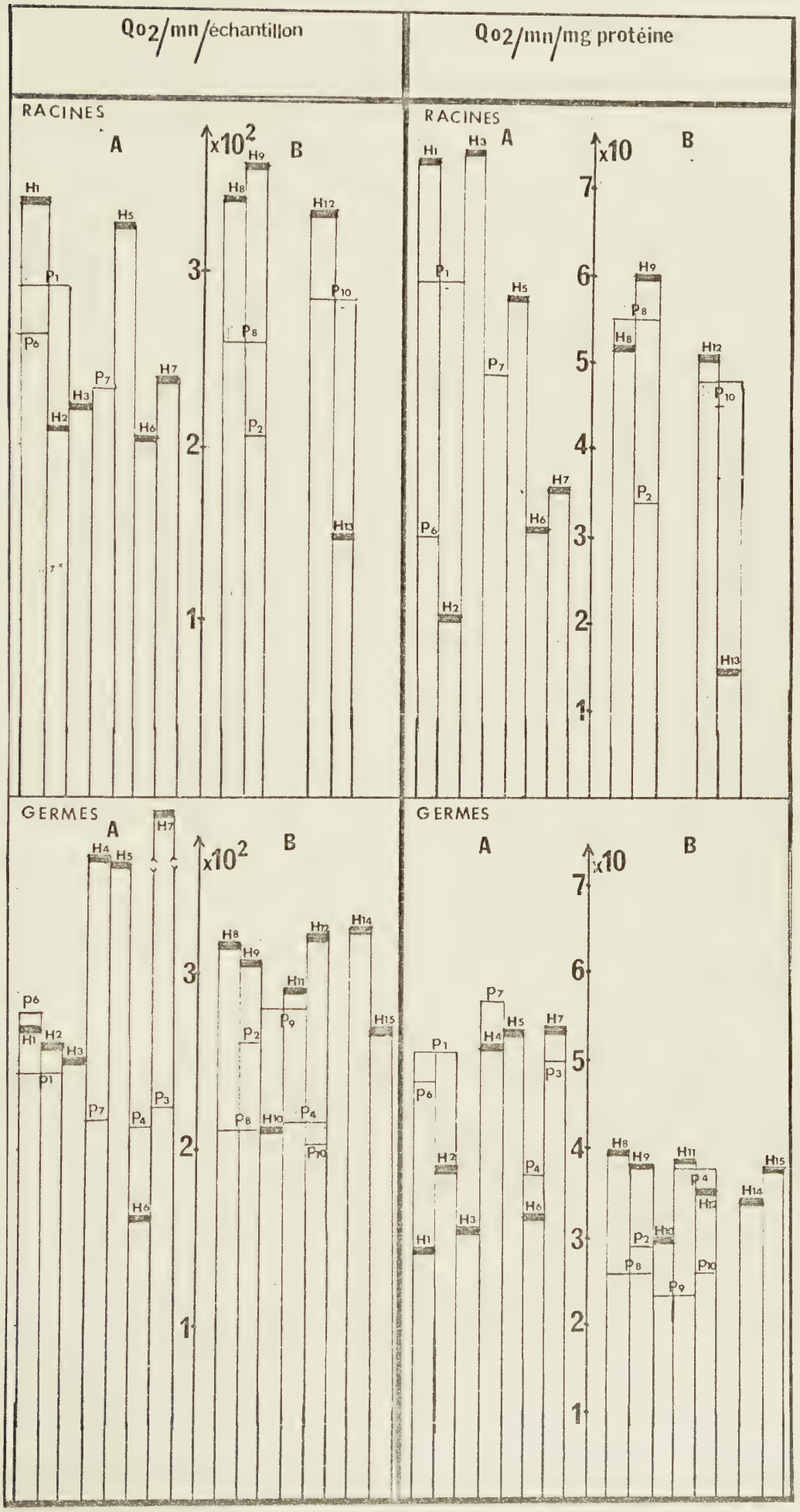
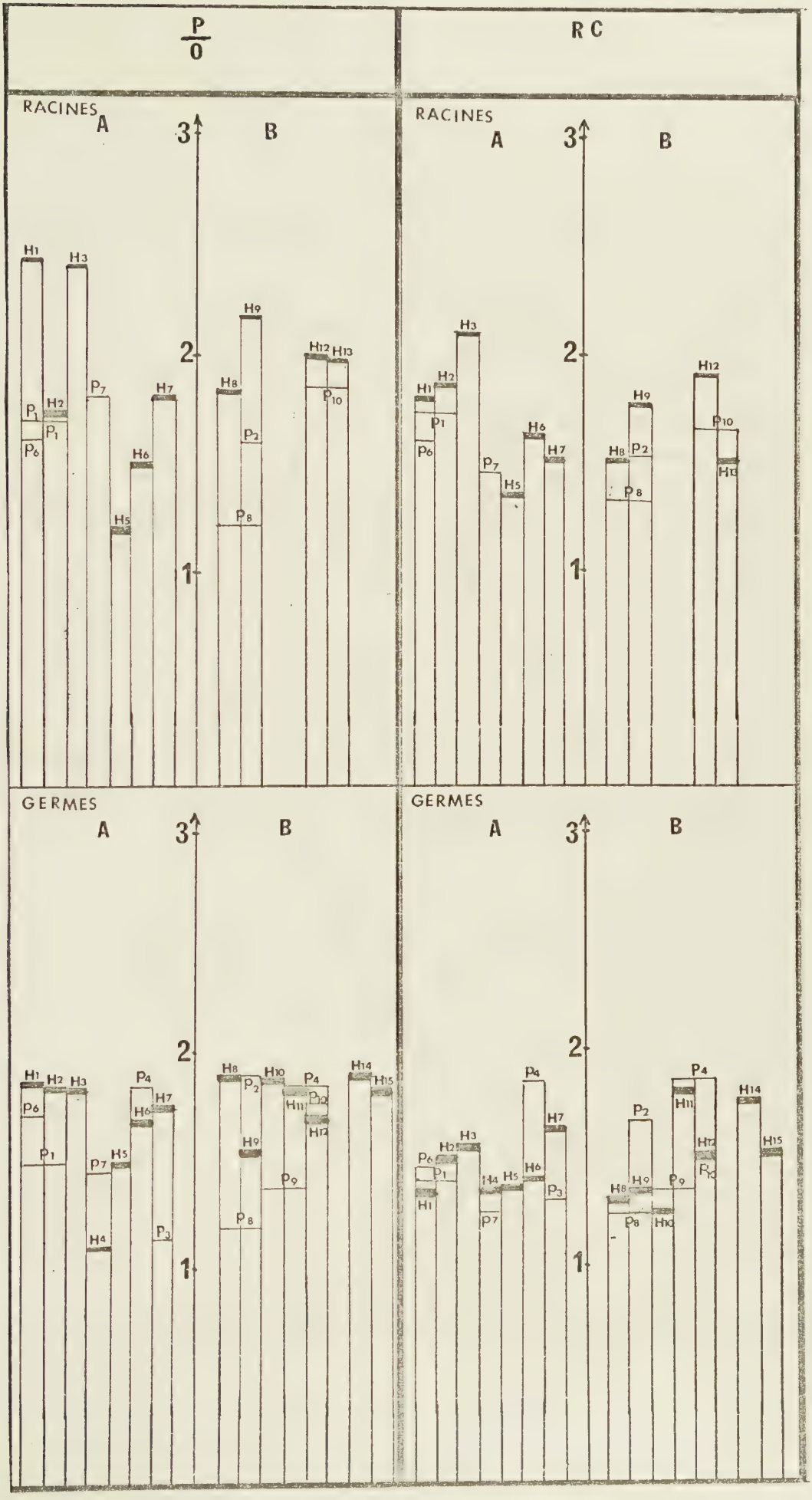
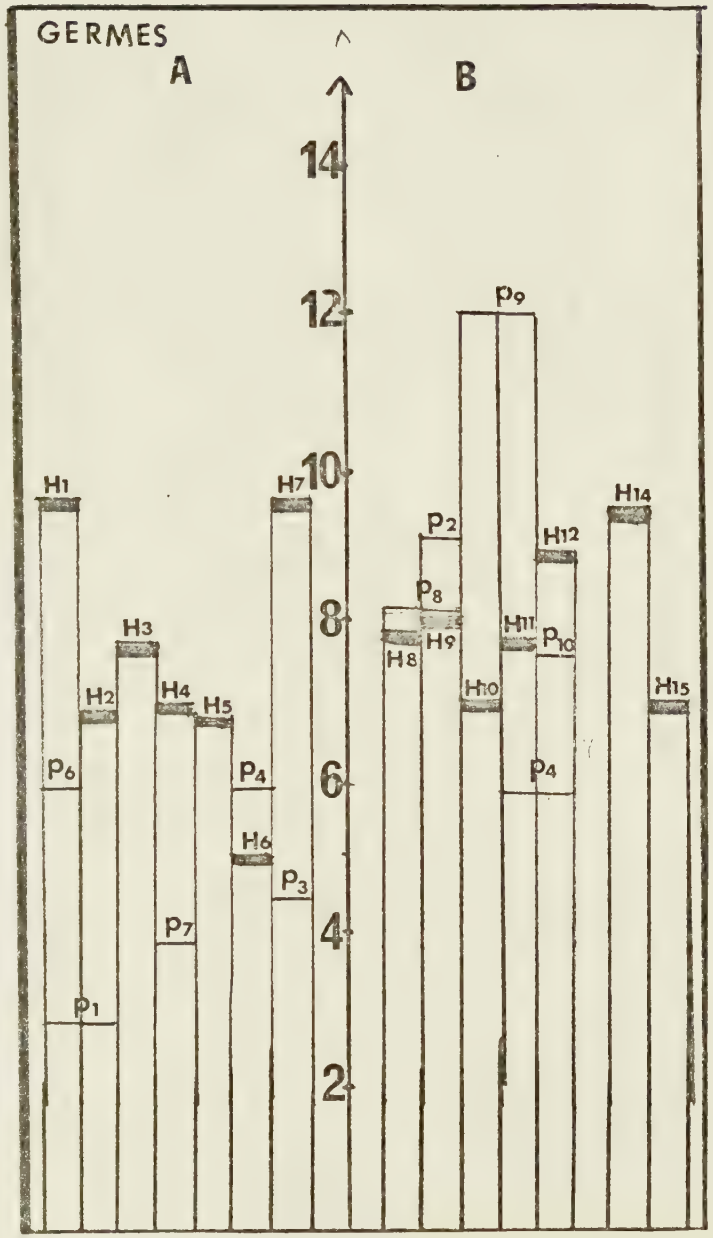
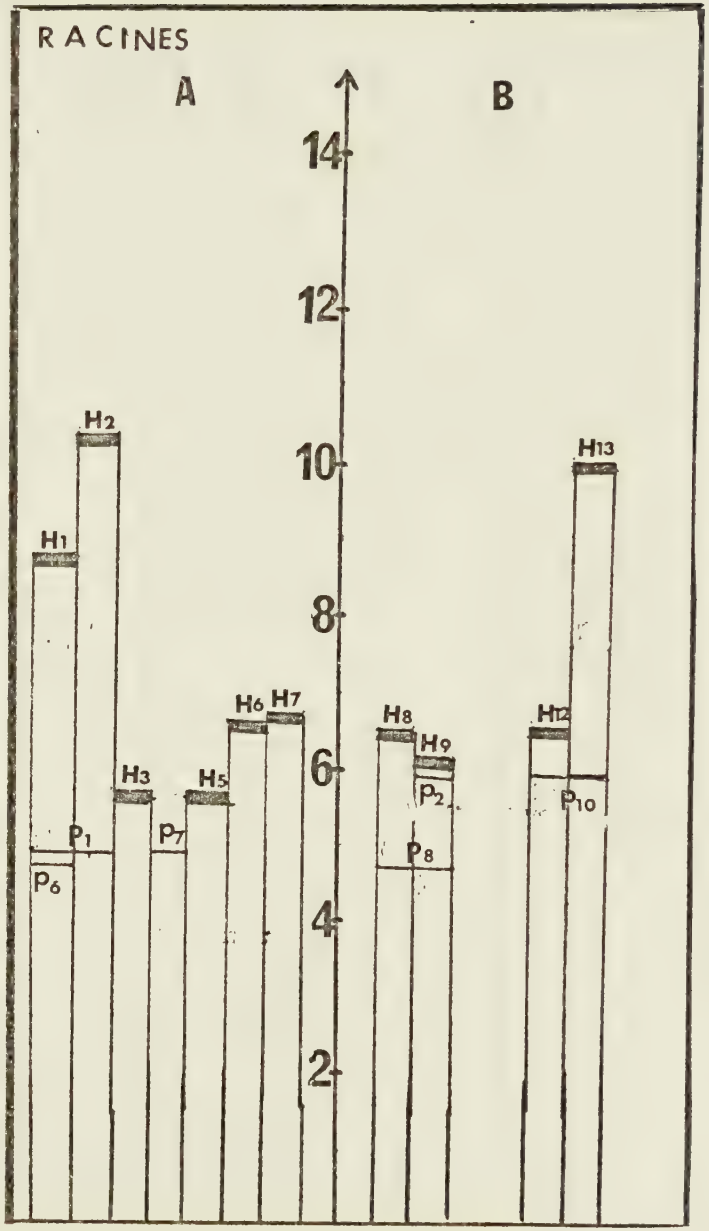


Figure 5b : Comparaison d'hybrides et des parents pour $\frac{ADP}{O}$ et RC




GERMES
A
B
14
12
10
8
6
4
2
H1
H2
H3
H4
H5
H6
H7
H8
H9
H10
H11
H12
H14
H15
P1
P2
P3
P4
P6
P7
P8
P9
P10


RACINES
A
B
14
12
10
8
6
4
2
H1
H2
H3
H5
H6
H7
H8
H9
H12
H13
P1
P2
P6
P7
P8
P10

on constate que l'hybride est pratiquement toujours supérieur à ses parents.

On remarquera dans le tableau 8 comparant 2 hybrides à leurs parents que les QO2 et les activités spécifiques respiratoires des hybrides sont inférieures à la moyenne des parents.

II-2-1-2 - L'ADP/O et le RC

Les figures 4 et 5b ainsi que le tableau 7 montrent que les ADP/O des hybrides sont nettement supérieurs à ceux des parents et que les racines ont des ADP/O supérieurs à ceux obtenus sur germes.

Dans le tableau 8 on remarquera que les hybrides ont des ADP/O supérieurs à la moyenne des parents.

En ce qui concerne l'indice de contrôle respiratoire (RC) on constate que les résultats obtenus sur racines montrent une nette supériorité des hybrides, ce que l'on ne retrouve pas avec les résultats obtenus à partir des germes où les hybrides et les parents sont trouvés très proches. Comme pour les ADP/O, dans le tableau 8 on remarque la nette supériorité des hybrides par rapport aux parents pour le RC.

Les meilleurs résultats sont toujours obtenus sur racines, comme pour les activités spécifiques respiratoires.

II-2-1-3 - Les protéines

La quantité de protéines extraites d'une même quantité de matières fraîches d'un même organe varie beaucoup d'un génotype à l'autre. Ici aussi, on notera que les hyvrides sont en moyenne supérieurs aux parents, aussi bien au niveau des germes que des racines. En revanche, il n'y a pas de différence notable entre germes et racines.

II-2-1-4 - L'hétérosis

Dans notre première expérience comparant des hybrides à leurs parents et dont les résultats figuent aux tableaux 6 et 7 , on remarque la supériorité hétérotique de l'hybride par rapport aux parents pour les ADP/O et les RC obtenus à partir de racines, cette supériorité étant moins nette pour les germes.

Pour les QO2 et les activités spécifiques respiratoires, la supériorité de l'hybride est moins évidente, elle n'apparaît réellement qu'en moyenne du matériel étu-

.../.

activités mitochondriales	Génotypes			$\frac{L452T + L414D}{2}$	% Hétérosis
	L452T x L414D	L452T	L414D		
Quantité de Protéïne mg	37,6	31,5	36,22	34	111
Q02 Micro atome par minute	316	345	361	353	90
Q02 / mg	8,4	11	10	10,5	80
ADP/O	1,71	1,51	1,51	1,51	113
RC	1,70	1,52	1,65	1,58	106
activités mitochondriales	L9T x D8D	L9T	D8D	$\frac{L9T \times D8D}{2}$	% Hétérosis
Quantité de Protéïne mg	39	31	32	31,5	112
Q02 Micro atome par minute	226	304	181	242	93
Q02 / mg	5,8	9,8	5,6	7,7	75
ADP/O	1,63	1,54	1,37	1,45	112
RC	1,87	1,46	1,89	1,67	112

dié.

En conclusion, l'avantage de l'hybride sur les parents est clairement mis en évidence, mais cet avantage apparaît plus nettement pour les ADP/O et les RC que pour les QO2 et les activités spécifiques d'une part, et pour les racines que pour les germes d'autre part.

Les meilleurs résultats obtenus sur racines nous ont conduit à préférer ce matériel pour les études ultérieures.

II-2-2 - Interprétation physiologique

II-2-2-1 - activités respiratoires

Les paramètres déterminés rendent compte du comportement des mitochondries isolées de germes et de racines. Le QO2 et les activités spécifiques sont certainement liés à la vigueur des graines et à leur capacité de consommation de l'oxygène.

Les hybrides ont des QO2 et des activités spécifiques en général, supérieurs aux parents (tableaux 6 et 7) ; mais des activités spécifiques faibles par rapport aux parents ne signifient pas que les hybrides ne soient pas vigoureux, on peut penser que les hybrides dans ces conditions ont un meilleur rendement, utilisent mieux l'énergie en synthétisant plus.

Les activités enzymatiques sont certainement supérieures.

II-2-2-2 - Les ADP/O et le RC

Des résultats et des interprétations donnés, la signification physiologique de ces ADP/O et RC semblent s'éclaircir ; les mitochondries d'un génotype donné caractérisent l'état énergétique de la plante ; l'ADP/O détermine l'efficacité des mitochondries c'est à dire la capacité à fabriquer une certaine énergie qui peut être restituée à la cellule entière.

L'ADP/O est une mesure du niveau potentiel des mitochondries ; il peut être relié à la supériorité catalytique des mitochondries hybrides qui peuvent résulter des changements conformationnels des membranes par contact particule à particule dans la cellule de ces hybrides. Cela suppose qu'il y aurait des populations différentes de mitochondries chez l'hybride ; malheureusement, aucune preuve concrète n'a encore été avancée ; seule, une purification des mitochondries des hybrides et des parents par gradient de saccharose permettrait de le démontrer.

.../.

Les différences entre les ADP/O, les RC et les QO2 des hybrides et des parents qui caractérisent l'hétérosis peuvent s'expliquer par des mécanismes de régulation au niveau moléculaire, c'est à dire des interactions de protéines, des interactions de membranes, des interactions noyau-mitochondries et aussi par le degré de structures tertiaires des protéines mitochondriales ; les paramètres ADP/O, RC et QO2 sont une vue partielle in vitro de ce qui se passe réellement in vivo.

II-2-2-3 - Les protéines

Les protéines totales dosées selon la méthode de LOWRY représentent :

- les protéines mitochondriales
- les protéines de différents débris cellulaires
- le BSA dont la quantité est fixe dans toutes les expériences.

Elles reflètent la capacité de synthèse des germes et des racines étudiées. Le fait que les hybrides aient un taux de protéines bien supérieur à leurs parents permet de penser qu'ils ont "plus de mitochondries". Cette quantité est une indication d'un meilleur potentiel de fonctionnement en considérant le métabolisme mitochondrial comme facteur limitant.

III - ACTION PARTICULIERE DU MALONATE

Quand on ajoute du malonate à concentration équimoléculaire avec l'α cétoglutarate lors de l'oxydation, on constate que les QO2 des états 2, 3, et 4 ainsi que les activités spécifiques respiratoires diminuent (tableaux 9 et 10) Il y a donc une inhibition partielle de la consommation d'oxygène.

Dans les mitochondries, une partie de l'α cétoglutarate est transformée en succinate (cycle de Krebs) or, le malonate est un inhibiteur compétitif de la succinate deshydrogénase puisqu'il peut occuper le site de fixation habituel du succinate.

Une partie de l'α cétoglutarate transformée en succinate, ne peut donc être utilisée comme substrat d'oxydation.

D'autre part, une partie de la voie du succinate étant bloquée, la voie de l'α cétoglutarate fonctionne

Tableau 9 : Comparaison des P/O et RC de mitochondries de germes avec et sans malonate.

génotypes	A D P/O		R C	
	KGA	KGA + malonate	KGA	KGA + malonate
L 7 T × D 6 D	1,82	1,70	1,50	1,52
L 451 T × L 644 D	1,68	1,58	1,41	1,38
L 430 T × L 644 D	1,70	1,74	1,52	1,33
L 238 T × L 270 D	1,54	1,37	1,35	1,16
L 431 T × L 414 D	1,89	1,81	1,77	1,78
L 416 D × L 506 P	1,75	2,20	1,64	1,68

Tableau 10a: Comparaison des activités spécifiques respiratoires à l'Etat 3 de mitochondries de germes avec et sans malonate. (u atome/mn/mg protéines)

Génotype	KGA	KGA + malonate
L 7 T × D 6 D	52,60	34,39
L 451 T × L 644 D	32,31	23,29
L 430 T × L 644 D	35,53	38,55
L 238 T × L 270 D	41,22	42,69
L 431 T × L 414 D	34,74	28,20
L 416 D × L 506 P	53,7	32

Tableau 10b: Comparaison des paramètres mitochondriaux obtenus avec des mitochondries isolées du génotypes nº 282 avec et sans malonate

cycles	K.G.A.				cycles	K.G.A. + Malonate			
	III	IV	ADP/O	RC		III	IV	ADP/O	RC
1 er	33,09	26,43	1,98	1,41	1 er	16,43	10,25	1,84	1,52
2 ème	41,26	28,91	1,82	1,57	2 ème	19,68	11,20	1,98	1,61
2 ème	43,64	27,44	1,66	1,60	3 ème	18,85	12,78	1,88	1,45
Moy.	39,33	27,59	1,82	1,53	Moy.	18,32	11,41	1,90	1,53

surtout, et dans ces conditions l'oxydation nécessite moins d'oxygène par mole de substrat, d'où des QO2 et des activités spécifiques plus faibles en présence de malonate (tableaux 9 et 10). En effet, le succinate a un ADP/O voisin de 2 alors que celui de l'α cétoglutarate est voisin de 4 (valeurs théoriques). La voie de l'α cétoglutarate étant prédominante en présence de malonate, les ADP/O trouvés doivent donc être plus élevés.

Le malonate doit être en quantité suffisante pour jouer son rôle d'inhibiteur. Ceci explique que dans certains cas, on n'observe pas de changements dans les QO2, ADP/O, RC etc... avec ou sans malonate.

L'intérêt du malonate est donc d'améliorer les $\frac{ADP}{O}$ et les RC quand on utilise l'α cétoglutarate comme substrat d'oxydation, mais, il est nécessaire d'étudier les concentrations à utiliser.

IV - LE CYTOCHROME OXYDASE - QUELQUES RESULTATS

Les figures 6 et 7 permettent d'extrapoler, à concentration infinie en cytochrome C réduit, la vitesse maximale de réaction dépendant du cytochrome oxydase, (LINEWEAVER et BURK).

Les mesures que nous avons effectuées sur un hybride et ses parents autofécondés montrent que (tableau

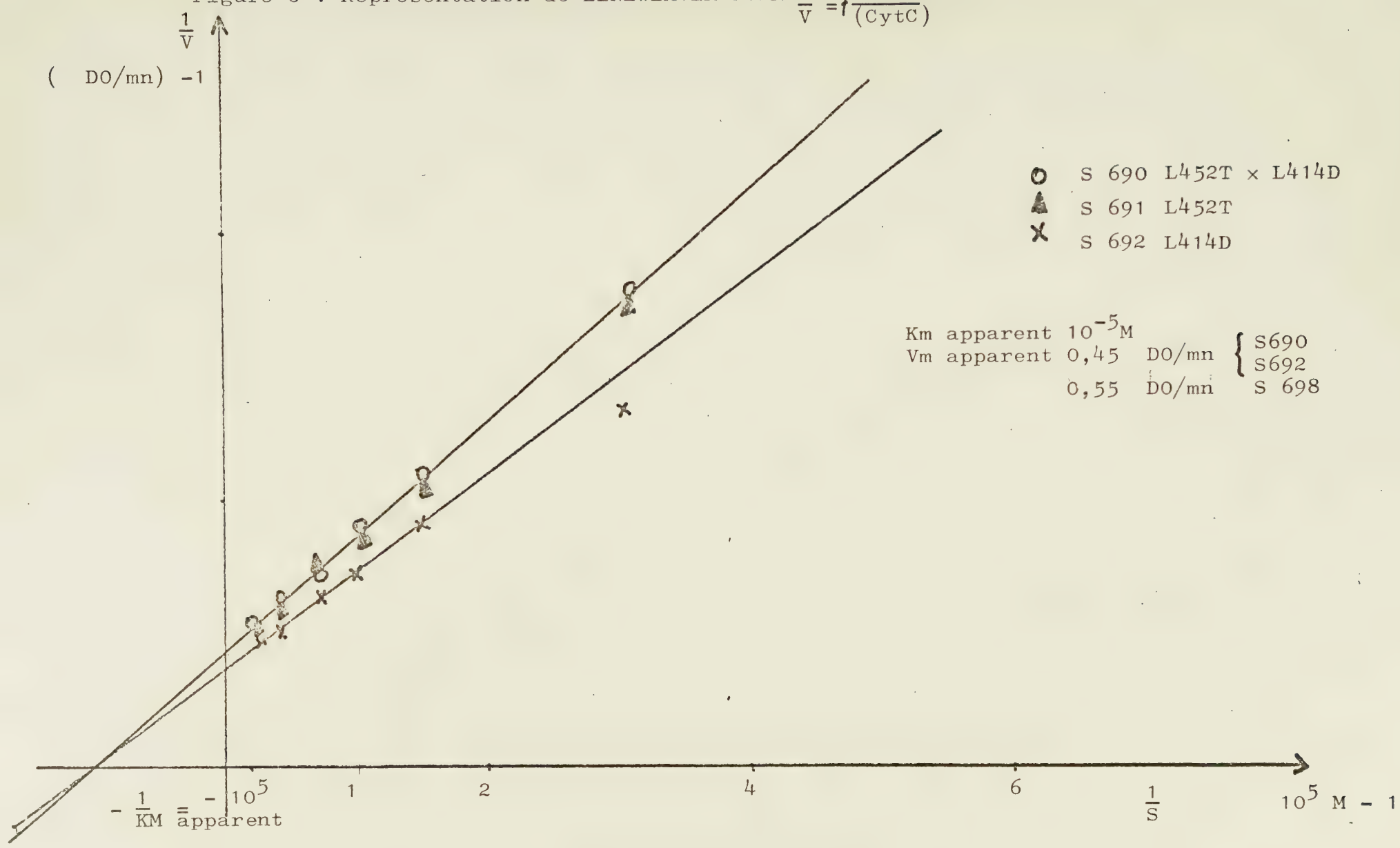
- en absence de Triton x 100 les vitesses maximales (VM) apparentes sont très voisines et les constantes de MICHAELIS (KM) sont identiques.

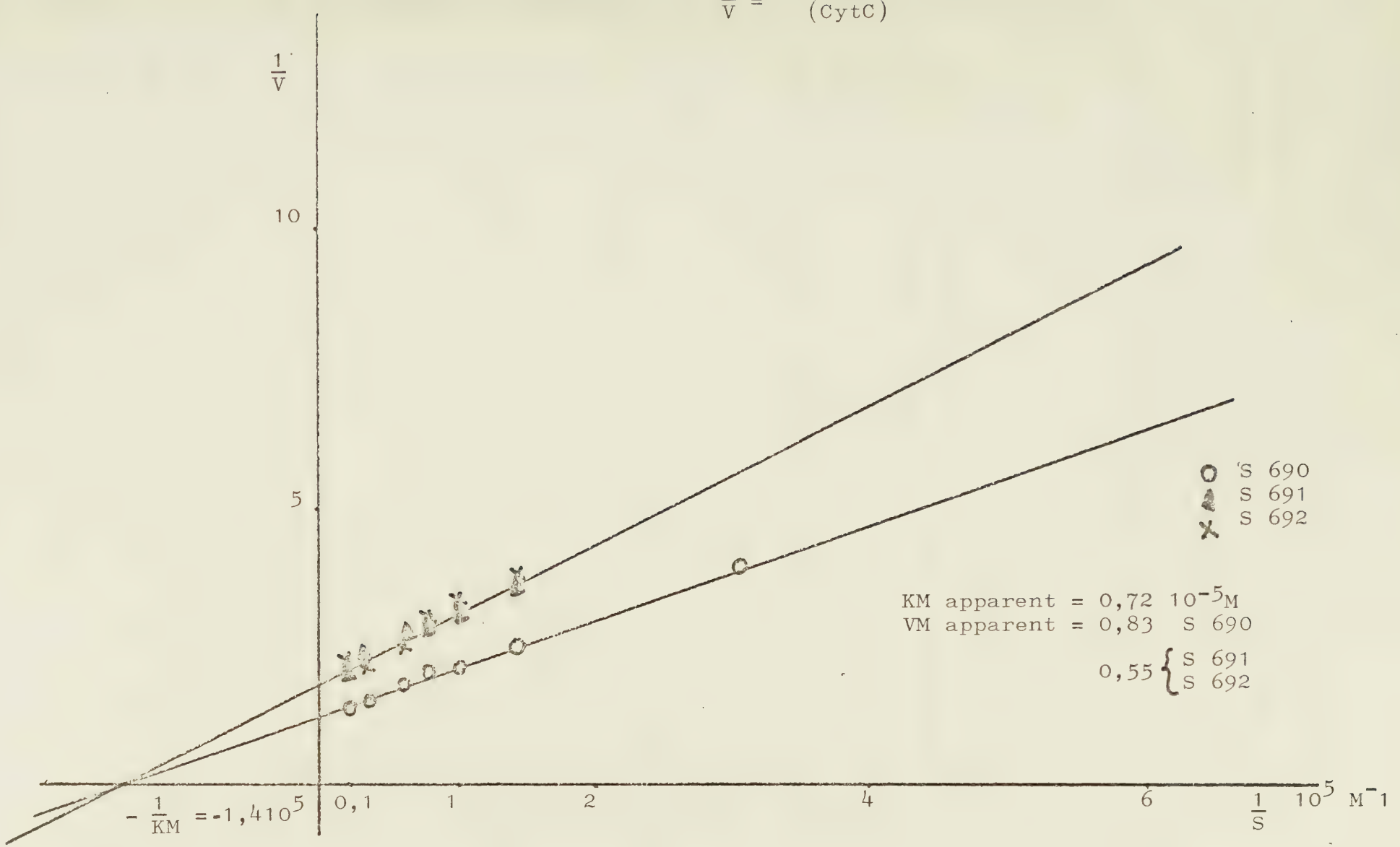
- en présence de Triton x 100 la VM apparente de l'hybride est plus élevée que celles des deux parents, les KM sont plus faible qu'en présence de Triton mais, restent identiques chez l'hybride et ses deux parents. La figure 7 illustre les résultats obtenus.

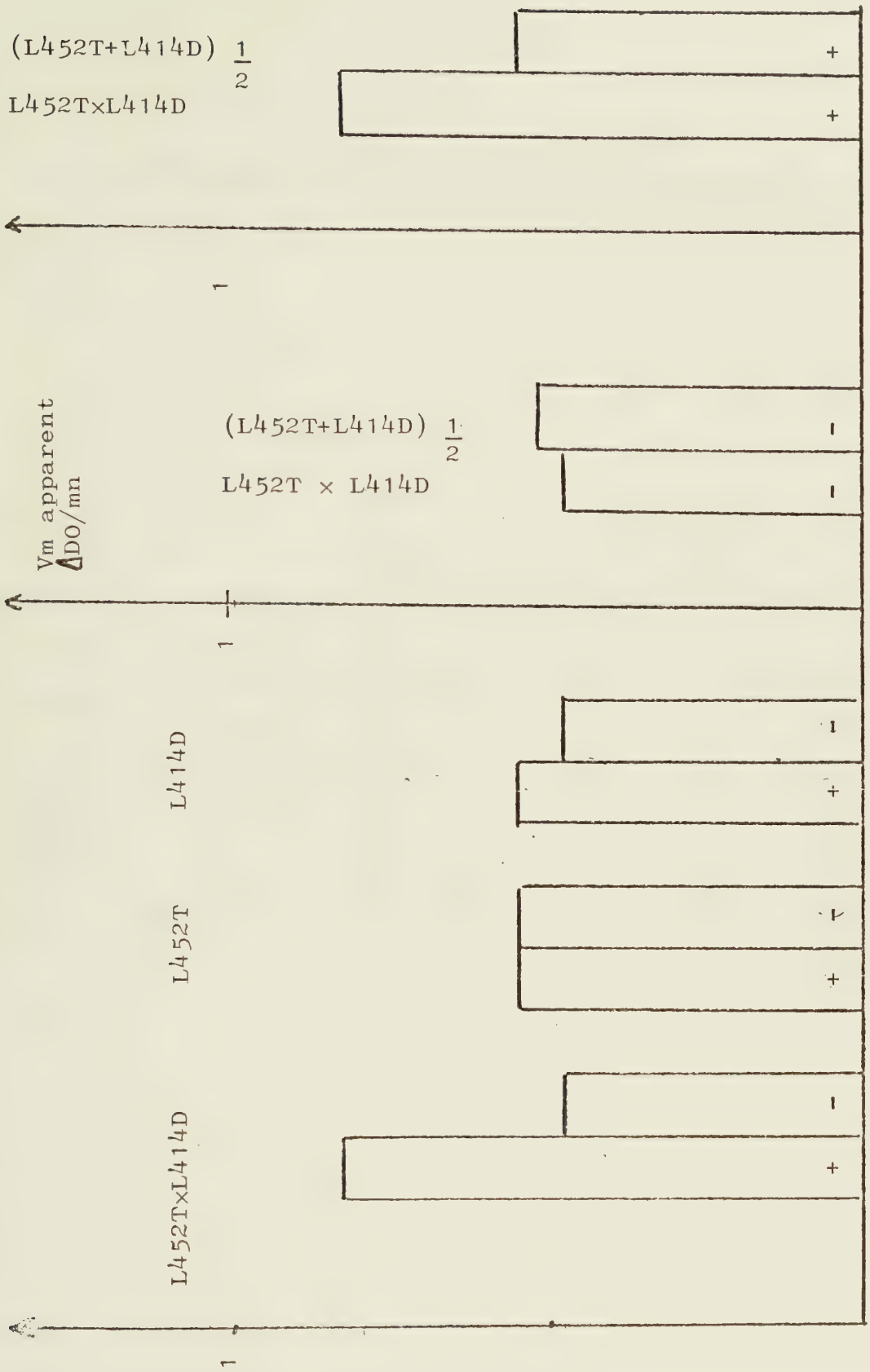
Il apparaît donc qu'en absence de Triton x 100 le site des enzymes est difficilement accessible par le cytochrome C. La perméabilité des membranes mitochondriales au cytochrome C ne semble pas différente chez l'hybride et ses parents. Lorsque l'enzyme est libérée sous l'action de Triton x 100, son affinité pour le cytochrome oxydase est améliorée, ce qui se traduit par un KM apparent plus faible.

.../.

Figure 3 : Représentation de Lineweaver-Burk $\frac{1}{V} = f\frac{1}{(CytC)}$




1/V
10
5
S 690
S 691
S 692
KM apparent = 0,72 10⁻⁵M
VM apparent = 0,83 S 690
0,55 { S 691 S 692
- 1/KM = -1,4 10⁵
0,1
1
2
4
6
1/S 10⁵ M⁻¹



et en absence (-) de Triton

Tableau 11 : Activité du cytochrome oxydase d'un hybride et de ses parents. (Triton 0,5 %)

		Génotypes		
		L452T × L414D	L452T	L414D
KM apparent	sans triton	10^{-5} M	10^{-5} M	10^{-5} M
	triton	$0,7110^{-5}$ M	$0,7110^{-5}$ M	$0,7110^{-5}$ M
VM apparent ADO/mn	sans triton	0,48	0,55	0,48
	triton	0,83	0,55	0,55

En conclusion, l'utilisation de triton × 100 est indispensable pour comparer les différents matériels, et d'autre part l'hybride apparaît comme beaucoup plus riche en cytochrome oxydase que ses parents.

Ces résultats sont un préliminaire à une étude plus approfondie du cytochrome oxydase que nous envisageons dans un programme à venir.

- Cinquième Partie -

COMPARAISON D'HYBRIDES

INTRODUCTION

La recherche d'un test pratique permettant de faire un tri dans un ensemble de croisements afin de ne tester en champs que les meilleurs présente un intérêt tout particulier pour une plante comme le palmier à huile.

En effet, le schéma général d'amélioration du palmier à huile est basé sur un système utilisant les performances de descendances. Le choix de ce schéma est principalement du au fait que de nombreux caractères importants de la production ont une héritabilité faible. De tels caractères ne peuvent être améliorés, avec de grandes chances de succès, que par la réalisation de tests.

Si l'on considère par ailleurs, que, pour réaliser et connaître un hybride, il faut 12 ans et une surface d'1/2 ha, on comprendra tout l'intérêt d'un tri, même imprécis, qui réduise le nombre d'hybrides que l'on testera en champs.

C'est dans cet esprit que deux expériences ont été entreprises. A notre connaissance, une seule étude comparant des hybrides a été publiée, HANSON et al. (1975).

I - MATERIEL VEGETAL

Les hybrides que nous avons comparés ont été plantés sur deux parcelles de la Station de La Mé (Côte d'Ivoire) en 1961. Chaque hybride est représenté par 5 lignes de 26 arbres (0,9 ha, la densité de plantation étant de 143 arbres/ha), ces lignes étant côte à côte.

Une parcelle est constituée de 42 lignes de 26 arbres et l'homogénéité est vérifiée par la plantation, à intervalles réguliers, d'un témoin. La production de régimes par arbre et par an en kg de 6 à 9 ans a été la suivante pour les différentes lignes de témoin sur les deux parcelles considérées ici :

.../.

Parcelles	Lignes					Moyennes
	2	23	24	40	41	
H 34	104,4	111,7	117,2	103,3	106,8	108,7
H 44	112,2	102,3	108,1	115,3	114,2	110,4
Moyennes	108,3	107,0	112,7	109,3	110,5	

Le choix des hybrides a été effectué de façon à disposer d'un large éventail de production. Leur situation sur le terrain est indiquée dans le schéma suivant, avec leurs productions en tonnes de régimes/ha/an et en tonnes d'huile par ha/an de 6 à 9 ans (le premier chiffre indique la production de régime, le second la production d'huile).

H 44

L5T × D6D	14,5	3,6
L2T × D10D	18,0	4,0
L16T × D3D	16,1	3,5
L11T × D10D	14,0	3,1
L5T × L269D	16,0	3,8
L2T × L269D	17,7	4,4
L7T × L268D	17,3	4,1

H 34

L9T × D132D	11,1	2,4
L9T × D104D	15,1	3,4
L9T × D109D	13,1	3,0
L3T × D10D	15,8	3,4
L10T × L268D	13,6	3,3

Pour chaque expérience, on a pris 8 hybrides

.../.

II - PREMIERE EXPERIENCE

II-1 - Echantillonnage.

Pour chaque hybride, on a prélevé 3 échantillons racinaires suivant la technique décrite dans la seconde partie. Sur chacun de ces 3 échantillons, on a effectué 3 mesures des activités mitochondriales. L'essai a duré 7 semaines et chaque semaine, on a traité 3 échantillons provenant de 3 hybrides différents.

La dimension de l'échantillon a été fixée après une courte étude et en tenant compte de la difficulté des prélèvements racinaires. Le nombre d'échantillon à traiter par semaine a été limité du fait des possiblités du laboratoire.

II-2 - Résultats et interprétation

Le tableau 12 regroupe les résultats pour les ADP/O (= P/O) et la consommation d'oxygène par minute et par mg de protéines (= O2). Ces résultats sont difficiles à interpréter par hybride étant donnée la variabilité observée. Notons que les ADP/O obtenus les 9/1 et 16/1 ne sont pas comparables aux autres car la concentration de l'ADP utilisé à varié de 54 mM à 72 mM entre ces deux premières mesures et les autres. Par ailleurs, l'oxygène consommé ramené au mg de protéines est théoriquement indépendant de la quantité de protéines extraites ; en fait, le poids des échantillons racinaires traités a varié de 10 à 20 g de matière fraîche et les quantités de protéines extraites de 20 à 43 mg. Or, on constate qu'avec de petits échantillons (10 g), on obtient un meilleur broyage et l'activité spécifique est généralement meilleure que lorsque l'on traite de plus gros échantillons.

Le faible nombre de résultats et leur importante variabilité nous a conduit à grouper les hybrides en 3 classes en fonction de leur production :

	ADP/O	O2
1 - L2T × D10D, L2T × L269D	2,57	7,67
2 - L16T × D3D, L5T × L269D, L3T × D10D	2,31	6,87
3 - L11T × D10D, L9T × D109D, L9T × D132D	2,21	6,51

.../.

Tableau 12 : Résultats de la première expérience sur les comparaisons d'hybrides

croisement	Production 6 - 9 ans en tonnes de régimes/ha/an	Caractéristiques en fonction des dates des mesures															
		9/1/1976		16/1/1976		23/1/1976		30/1/1976		6/2/1976		5/3/1976		5/3/1976	
		P/O	O2	P/O	O2	P/O	O2	P/O	O2	P/O	O2	P/O	O2	P/O	O2	P/O	O2
L2T × D10D	18,0									2,18	8,73	2,35	7,31	2,45	5,45
L2T × L269D	17,7	1,68	11,60	1,59	7,94	2,82	5,01								
L16T × D3D	16,1									2,33	6,62	2,17	10,62	2,43	4,89
L5T × L269D	16,0	1,37	5,26	1,26	6,25	1,82	4,14								
L3T × D10D	15,8	1,34	5,87	1,42	9,95			2,31	8,24						
L11T × D10D	14,0	1,45	6,90	1,77	3,36			2,14	7,17						
L9T × D109D	13,1					1,77	5,35	2,30	6,50	2,49	6,59				
L9T × D132D	11,1					2,12	5,36	2,71	8,28	2,08	9,12				

Les ADP/O ainsi que les activités spécifiques semblent donc liés à la production de régime et mesurer l'hétérosis au niveau mitochondrial.

Il est interessant de remarquer qu'un choix de 50 % des meilleurs hybrides en fonction des activités mitochondriales aurait conduit à retenir 4 des 5 hybrides qui se sont effectiviement révélés les meilleurs en test ; ajoutons enfin, que les deux hybrides L2T x D10D et L2T x L269D donnent les meilleurs ADP/O et sont effectiviement les meilleurs en champ.

III - DEUXIEME EXPERIENCE

A la suite de la première expérience ayant donné des résultats positifs et interessants mais insuffisants pour une interprétation statistique, nous avons effectué une seconde expérience plus complète et plus systématique en essayant de diminuer au mieux la variabilité liée à l'échantillonnage et aux conditions expérimentales.

III-1 - Echantillonnage - Conditions expérimentales

Un nouveau choix d'hybrides à comparer a été effectué et 8 ont été retenus. L'expérience a duré 6 semaines et chaque semaine, le même jour, on a traité 8 échantillons provenant des 8 hybrides.

Chaque échantillon était constitué de 20 g d'extrémités de racines principales prélevées entre deux arbres du même hybride ; les prélèvements ont été fait de façon régulière sur chaque hybride de manière à couvrir au mieux la surface occupée par chaque hybride.

L'isolement des mitochondries a été effectué sur chaque échantillon en prélevant exactement 10 g de matière fraîche.

La concentration de l'ADP a été vérifiée chaque semaine et était de 73 mM.

L'ordre de traitements des 8 échantillons a été fait au hasard chaque semaine.

.../.

III-2 - Résultats et interprétation

Les résultats sont regroupés au tableau 13 pour les ADP/O (P/O), les RC et les activités spécifiques (O2)

III-2-1 - L'ADP/O

Chaque valeur du tableau 13 correspond à la moyenne de trois cycles de phosphorylation sur une seule trace. L'analyse statistique a été faite suivant un schéma en blocs complets : 8 objets (hybrides) et 6 répétitions. (semaines)

L'analyse de variance est la suivante :

Source de Variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carrés moyens	F calculé	Tables 5%	1%
totale	1,55606	47				
Blocs	0,41776	5				
Objets	0,69916	7	0,09988	7,960**	2,30	3,2
Erreur	0,43913	35	0,012546			

sm = 0,04572
PPDS 5% = 0,13134 PPDS 1% = 0,17635

Il existe donc des différences entre hybrides qui sont assez marquées. Nous avons utilisé le test de DUNCAN pour effectuer les comparaisons.:

hybride	Production (tonnes/ha/an) régimes	huile	ADP O	Résultats test de DUNCAN à 5%
- L7T x L268D	17,3	4,1	1,821	Différent de 4,5,6,7,8
- L2T x L269D	17,7	4,4	1,741	" 4,5,6,7,8
- L2T x D10D	18,0	4,0	1,683	" 7,8
- L5T x D6D	14,5	3,6	1,591	"
- L10T x L268D	13,6	3,3	1,578	
- L9T x D109D	13,1	3,0	1,555	
- L9T x D132D	11,1	2,4	1,470	
- L11T x D10D	14,0	3,1	1,451	

Le classement en fonction de l'ADP/O correspond assez bien à celui de la valeur au champ des hybrides. Les deux meilleurs hybrides, au point de vue production, se détachent également nettement par leurs ADP/O. A noter cependant que les trois premiers hybrides ne peuvent être consi-

..../.

Tableau 13 : Résultats de la seconde expérience sur les comparaisons d'hybrides

L2T × D10D			L2T × L269D			L7T × L268D			L5T × D6D		
P/O	RC	O2	P/O	RC	O2	P/O	RC	O2	P/O	RC	O2
1,66	1,78	6,03	1,82	1,90	5,35	1,79	1,93	7,39	1,53	1,66	5,57
1,68	1,84	10,66	1,73	1,69	6,86	1,86	1,95	13,10	1,52	1,97	14,64
1,54	1,47	8,10	1,70	1,64	22,02	1,61	1,65	6,46	1,56	1,45	10,92
1,87	1,81	17,28	1,60	1,33	10,11	1,78	1,61	11,92	1,69	1,62	14,04
1,47	1,49	11,63	1,81	1,79	12,59	1,93	1,90	16,38	1,45	1,41	11,42
1,88	1,79	-	1,79	1,81	-	1,96	2,02	-	1,78	1,80	-
1,68	1,70	10,74	1,74	1,69	11,38	1,82	1,84	11,05	1,59	1,65	11,32

L11T × D10D			L10T × L268D			L9T × D109D			L9T × D132D		
P/O	RC	O2	P/O	RC	O2	P/O	RC	O2	P/O	RC	O2
1,42	1,71	7,06	1,53	1,87	8,79	1,43	1,27	4,88	1,28	1,51	4,25
1,10	1,27	8,21	1,60	1,60	9,26	1,65	1,64	8,19	1,37	1,43	7,26
1,37	1,48	4,82	1,36	1,23	4,85	1,35	1,51	11,31	1,46	1,72	7,57
1,48	1,42	14,85	1,59	1,63	11,18	1,59	1,35	9,61	1,48	1,44	11,82
1,62	1,63	16,28	1,67	1,63	10,60	1,55	1,56	8,57	1,51	1,61	11,66
1,72	1,89	-	1,72	1,99	-	1,76	2,02	-	1,72	1,73	-
1,45	1,57	10,24	1,58	1,66	8,94	1,55	1,56	8,51	1,47	1,57	8,51

dérés comme significativement différents pour leur valeur au champ, ils ne le sont pas non plus pour leurs ADP/O ; en effet, le test de Scheffé montre que le groupe des trois premiers hybrides est significativement différent du groupe des cinq autres : s'ils n'étaient pas différents, le contraste

$$\varphi = \frac{1 + 2 + 3}{3} - \frac{4 + 5 + 6 + 7 + 8}{5}$$

ne devrait pas être supérieur à :

$$s_\varphi F \begin{matrix} k - 1 \\ N - k \end{matrix}$$

k étant le nombre d'hybrides en comparaison, N le nombre total d'observations avec

$$s^2_\varphi = \frac{s^2}{6} \left(\frac{1}{3}^2 + \frac{1}{5}^2 \right)$$

Or, on trouve $\varphi = 0,2193$ supérieur à

$$s_\varphi F \begin{matrix} 7 \\ 40 \end{matrix} = 0,1325 \text{ à } 5\ \%$$

Les corrélations entre l'ADP/O et la production sont bonnes :

ADP/O - production de régimes $r = 0,8543^{**}$
ADP/O - production d'huile $r = 0,8855^{**}$

III-2-2 - Le RC

Chaque valeur du tableau 13 correspond, comme pour l'ADP/O à la moyenne de trois mesures. L'analyse statistique ne permet pas de différencier les hybrides. On constate cependant, que le RC est en corrélation avec la production.

hybride	Production en tonnes/ha/an Régimes	Huile	RC
L2T × D10D	18,0	4,0	1,696
L2T × L269D	17,7	4,4	1,693
L7T × L268D	17,3	4,1	1,843
L5T × D6D	14,6	3,6	1,651
L11T × D10D	14,0	3,1	1,566
L10T × L268D	13,6	3,3	1,658
L9T × D109D	13,1	3,0	1,558
L9T × D132D	11,1	2,4	1,573

.../.

RC - production de régime r = 0,7570 *
RC - production d'huile r = 0,7753 *

Sans être un critère précis, le RC peut cependant être utilisé pour comparer des hybrides.

II-2-3 - L'activité spécifique

Dans le tableau 13, la 6ème répétition a été supprimée, les dosages de protéines ayant donné des résultats difficilement explicables comparés aux cinq autres répétitions ; il peut s'agir d'une erreur de dosage aussi, avons nous préféré éliminer ces résultats.

L'analyse statistique ne permet pas de différencier les hybrides (F non significatif), mais, on constate des corrélations significatives entre l'activité spécifique et les données de production.

hybride	Production en tonnes/ha/an régimes	huile	activité spécifique
L2T x D10D	18,0	4,0	10,740
L2T x L269D	17,7	4,4	11,386
L7T x L268D	17,3	4,1	11,050
L5T x D6D	14,6	3,6	11,318
L11T x D10D	14,0	3,1	10,244
L10T x L268D	13,6	3,3	8,936
L9T x D109D	13,1	3,0	8,512
L9T x D132D	11,1	2,4	8,512

Activité spécifique - production de régimes r = 0,8179 *
Activité spécifique - production d'huile r = 0,8429 **

Comme le RC, l'activité spécifique peut être utilisé comme critère de comparaison d'hybrides.

III-3 - Conclusion

Les trois paramètres caractérisant les activités mitochondriales d'hybrides ont été trouvés en bonne relation avec la valeur agronomique de ces hybrides. Il apparaît que l'ADP/O est le paramètre donnant la meilleure précision, mais, il est important de remarquer qu'il est possible de confirmer les résultats obtenus avec l'ADP/O en utilisant le RC et l'activité spécifique.

Nous noterons que ces résultats ont été obtenus sur un matériel ayant voyagé depuis la Côte d'Ivoire et qu'il

.../.

est sans doute possible d'obtenir plus de précision avec un matériel végétal très frais et plus de répétitions.

Les résultats actuels permettent d'envisager d'utiliser cette méthode pour trier des hybrides de palmier à huile dans un programme d'amélioration, ce tri étant alors effectué à un stade très jeune, sur racines de graines germées par exemple.

- Sixième partie -

CONCLUSIONS GENERALES

Nos recherches ont porté sur l'hétérosis au niveau des mitochondries isolées d'organes différents de palmier à huile - Elaeis Guineensis Jacq.)

Après avoir exposé quelques données bibiliographiques sur l'hétérosis et sur les mitochondries, nous avons décrit les différents matériels végétaux utilisés (inflorescences, germes, racines).

Le développement des techniques d'isolements et de mesures des activités mitochondriales étaient nécessaires. Nous nous sommes d'abord penchés sur la recherche de milieux adéquats permettant d'obtenir des mitochondries en bon état physiologique. L'ensemble des résultats auxquels nos recherches ont abouti peut se résumer ainsi :

- les milieux testés sur inflorescences n'ont pas donné entière satisfaction ; les activités spécifiques, les ADP/O et les controles respiratoires sont très faibles. Cela nous a ammené à envisager une étude approfondie d'un milieu de broyage spécifique.

- les essais effectués sur germes et racines de graines germées ont été très encourageants car nous avons obtenu des mitochondries bien couplées avec le milieu que nous avons mis au point. Les paramètres déterminés montrent en général une différence notable entre les hybrides et les parents. Les ADP/O et les RC des hybrides sont plus élevés et présentent ainsi un "hétérosis positif". Les quantités de protéines totales des hybrides sont supérieures à celles des parents ; les hybrides ont dans la plupart des cas des meilleures performances biochimiques.

En général les racines nous ont donné des paramètres (QO2, ADP/O et RC) plus élevés que les germes ; c'est ce qui nous a conduit à préférer les racines pour comparer différents hybrides.

Une étude succinte de l'activité de la cytochrome oxydase d'un hybride et de ses parents montre que l'hybride a une vitesse maximale apparente supérieure à la moyenne de ses deux parents.

Dans deux expériences, nous avons comparé des hybrides dont la valeur agronomique était connue et nous avons montré qu'il existait une relation assez étroite entre leurs activités mitochondriales (activités spécifiques respiratoires, ADP/O et RC) et leurs productions en champ..Le choix des meilleurs hybrides en fonction de leurs activités mitochondriales aurait conduit à retenir ceux qui se sont effectivement révélés les meilleurs en essai comparatif.

.../.

La variabilité au niveau des activités des particules cellulaires notamment les mitochondries, peut donc être un moyen d'évaluation de l'hétérosis ; il est donc possible d'envisager l'utilisation pratique de la mesure de l'hétérosis au niveau mitochondrial comme critère de criblage d'un ensemble de génotypes de palmier à huile.

La réalisation des tests d'hybrides chez le palmier à huile est particulièrement longue et onéreuse, et l'avancement de la sélection est tel qu'il est impossible de tester tous les hybrides. La mise au point d'un test précoce, à partir des résultats que nous avons obtenus, présente donc un grand intérêt pour l'amélioration de cette plante.

- B I B L I O G R A P H I E -

BERGMEYER H.U., JAWOREK D., et GRUBER W. (1974)

Adenosine 5 diphosphate
Methods of enzymatic analysis 4 : 2127-2129
Academic Press, Inc.

BEIRNAERT A. (1935)

Introduction à la biologie florale du Palmier à huile
I.N.E.A.C Série Scient. 5

BERVILLE A. et DEMARLY Y. (1970)

La stérilité mâle cytoplasmique
C.R. Eucarpia (Versailles) 10-12 juin

BONNER W.D. (1967)

A général method for the preparation of plant mitochondria :
in R.W. ESTABROOK and M.E. PULLMAN ed ;
Methods in Enzymology Vol X ; 126-133
Academic Press, Inc.

BREWBAKER J.L. 1964

Agricultural génétics
Prentice Hall. Inc, Englewood cliffs New Jersey

CHANCE B. et WILLIAMS G.R. (1955 a)

Respiratory enzyme in oxidative phosphorylation
I. Kinetics of oxygen utilisation
J. Biol. Chem. 193 : 383-393

CHANCE B. et WILLIAMS G.R. (1955 b)

A simple and rapid assay on oxidative phosphorylation
Nature, 175 : 1120-1121

.../.

CHANCE B., BONNER W.D. and STOREY B.T. (1968)

Electron transport in respiration
Ann. Rev. Plant Physiol. 19 : 295-320

CROW J.F. (1952)

Dominance and over dominance in hétérosis
J.W. GOWEN ed. IOWA State College Press

DAVIES C. (1962)

Principe de mesure polarographique de l'oxygène
Physical Techniques in Biological Research 4 : 137
Academic Press, Inc.

DEMARLY Y. (1972)

Regulation et hétérosis
Ann. Amélioration Plantes 22 : 2

DONEY D.L., THEURER J.C. and WYSE R.E. (1972)

Mitochondrial complementation in sugar beet.
Crop Science 12 : 493-494

DONEY D.L., WYSE R.E. and THEURER J.C. (1975)

Mitochondrial efficiency and growth rate in sugar beet
Crop Science 15 : 5-7

EAST E.M. and HAYES H.K. (1912)

Heterozygosis in evolution and in plant breeding
US Dept. Agric. Bur. Plant indust. Bull 243 : 1-58

ERNSTER L. and LUFT R. (1964)

Mitochondrial respiratory Control :
Biochemical, physiological and pathological aspects
Advan. Metab. Disorders 1 : 95-123

ERNSTER L. and NORDENBRAND K. (1967)

Skeletal muscle mitochondria
Methods in enzymology Vol X : 86-94
Academic Press, Inc.

.../.

ESTABROOK R.W.(1967)

Mitochondrial Respiratory controle and polarographic measurement of ADP/O ratios
Methods in enzymology
Academic Press, Inc. Vol X : 41-47

FINCHMAN J.R.S. (1972)

Heterozygous advantage as a likely gene basis for enzyme polymorphisms.
Heredity G.B. 28 nº 3

GASCON J.P. et DE BERCHOUX Ch. (1964)

Caractéristiques de la production d'Elaeis Guineensis Jacq. de diverses origines et de leurs croisements. Application à la sélection du Palmier à huile.
Oléagineux 19è année nº 2 : 75-84

GASCON J.P., NOIRET J.M. et BENARD G. (1966)

Contribution à l'étude de l'héridité de la production de régimes d'Elaeis Guineensis Jacq. Application à la sélection du palmier à huile.
Oléagineux 21è année nº 11 : 657-661

GREEN D.E and Mc LENNAN D.H. (1969)

Structure and function of the mitochondrial cristael membrane.
Bioscience 19 : 213-222

HAARD N.F. and HULTIN H.O. (1968)

An improved technique for the isolation of mitochondria from plant tissue.
Anal. Biochem. 24 : 299-304

HAGEMAN R.H., LENG E.R. and DUDLEY J.W. (1967)=

A biochemical approach to corn breeding
Adv. Agron. 19 : 45-83

HALL D.O. and PALMER J.M. (1969)

Mitochondrial research today
Nature 221 : 717-723

.../.

HANSON W.D., MORELAND D.E. and SHRINEZ C.R. (1975)

Correlation of mitochondrial activities and Plant Vigor genotypic backgrounds in maize ans soybeans
Crop Science 15 : 5-7

HENRI P. (1957)

Recherche sur la croissance et le développement chez Elaeis Guineensis Jacq. et chez cocos nucifera (L) comparaison avec quelques autres palmiers
Thèse Université de PARIS

HOBSON G.E., LANCE C., JOUNG R.E. and BIALE Y.B. (1966)

The isolation of active subcellular particle of the avocade fruit at various stages of ripeness.
Nature 209 : 1242-1243

HORRIE S. and MORRISSON M. (1963)

Cytochrome oxydase components
J. Biol. Chem. 238 : 1855-1860

HULME A.C., JONES J.D. and WOOLTORTON L.S.C. (1964)

Mitochondrial preparation from the fruit of the apple
I. Preparations and general activity
Phytochemistry 3 : 173-188

IKUMA H. and BONNER W.D. (1967)

Proprieties of higher plant mitochondria
I. Isolation and some characteristics of tightly coupled mitochondria from dark grown mung bean hypocotyls
Plant Physiol. 42 : 67-75

IKUMA H. (1970)

Necessary conditions for isolations of tightly coupled higher plant mitochondria
Plant Physiol. 45 : 773-781

JINKS J.L. (1964)

Extra-chromosomal inheritance
Prentice Hall - Englewood cliffs New Jersey

JOLLIOT A. et MAZLIAK P. (1973)

Rôle des lipides dans diverses activités enzymatiques de la chaine de transport des électrons d'une fraction mitochondriale isolée d'inflorescence de chou-fleur.
Plant. Sci. Letters Nesherl L 1 : 21-29

JONES D.F. (1958)

Heterosis and homeostasis in evolution and in applied genetics
Amer. Natur. 92 : 321-328

KEEBLE F. and PELLEW C. (1910)

The mode of inheritance of stature and time of flowering in peas (Pisum Savatum)
J. Genetics 1 : 47-56

KRIDEL D.I. (1972)

Mitochondrial complementation and heterosis in pisum sativum L.
Thèse universitè of Arizona.

LANCE C., HUBSON G.E., YOUNG R.E. and BIALE J.C. (1965)

Metabolic Processus in cytoplasmic Particles of the Avocado fruit.
VII - oxydative and phosphorylative activities throughout theclimateric cycle.
Plant Physiol. 40 : 1116-1123

LANCE C. et CHAUVEAU M. (1975)

Evolution des activités oxydatives et phosphorylantes des mitochondries de l'Arum maculatum L. au cours du développement de l'inflorescence.
Physiol. Veg. 13 : (1) 83-94

LEHNIGER A.L. (1964)

The Mitochondrion : Molecular Basis of Structure and Function
W.A. Benjamin New York

Mc DANIEL R.G. and SARKISSIAN I.V. (1968)

Mitochondrial heterosis in maize
Genetics 59 : 465-474

Mc DANIEL R.G. (1969)

Relationship of seed weight, seedling vigor and mitochondrial metabolism in barley.
Crop Science 9 : 823-827

.../.

Mc DANIEL R.G. (1971)

Mitochondrial heterosis in Barley : R.A. NILAN ed. BARLEY genetic II. Washington state university press Pullman 323-337

Mc DANIEL R.G. (1972)

Mitochondrial complementation as biochemical measures of yield.
Nature New Biology 236 : 190-191

Mc DANIEL R.G. (1973)

Genetics factors influencing seed vigor : biochemistry of heterosis.
Seed. Sci. and Technol. 1 : 25-50

Mc DANIEL R.G. and SARKISSIAN I.V. (1966)

Heterosis and complementation by mitochondria
Science 152 : 1640-1642

MALHOTRA S. and SPENCER M. (1971)

Proprieties of mitochondria prepared by two different isolation procedures from the cotyledons of germinating bean seedling
J. of Experimental Botany 22 n° 70 : 70-77

MAZLIAK P. (1968)

Relation entre l'activité respiratoire et la biosynthèse des acides gras dans les mitochondries isolées d'inflorescences de chou-fleur
Brassica Olaracea variété botritis L.
C.R. Acad. Sci. PARIS 267 : 1620-1723

MAZLIAK P. et KADER A. (1972)

Biosynthèse des acides gras dans les mitochondries végétales isolées.
Eur J. of Biochem. 28 : 399-411

MEYER A.J. and KAREL Van Dam (1971)

oxidation and energy conservation by mitochondria.
Annual Review of Biochemistry 40 : 115-160

.../.

MOREAU F. et LANCE C. (1972)

Isolement et propriétés des membranes externes et internes de mitochondries végétales.
Biochimie 54 : 1335-1348

NICLOUX M. (1930)

Dosage de l'oxygène dans l'eau de mer
C.R. Acad. Sci. PARIS 191 : 259-261

KU HUNSAN PROTT H.K. S. PURR A.R. and HARRIS W.M. (1968)

Isolation of activie mitochondria from tomato fruit,
Plant Physiol. 43 : 883-887

PALMER J.M. (1967)

Rapid isolation of mitochondria from plant tissue
Nature 216 : 1208

PULLMAN M.E. and G.SCHATZ (1967)

Mitochondrial oxidation and energy coupling
Ann. Rev. Biochem. 36 : 539-610

REID H.B., GENTILE A.C. and KLEIN R.M. (1964)

Adenosine triphosphatase activity of cauliflower mitochondria
Plant. Physiol. 39 : 1020-1023

ROUMANI R.J., IDA K. YU and FISHER L.K. (1969)

Isolation of tightly coupled mitochondria from acidic plant tissues.
Plant Physiol. 44 : 311-312

SARKISSIAN I.V. and SRIVASTAVA H.K. (1968)

On the methods of isolation of active, tightly coupled mitochondria of wheat seedlings.
Plant Physiol. 43 : 1406-1410

SARKISSIAN I.V. and SRIVASTAVA H.K. (1969)

High efficiency, heterosis and homeostasis in mitochondria of wheat
Proc. Nat. Acad. Sci. US 63 : 302-309

.../.

SRIVASTAVA H.K. and SARKISSIAN I.V. (1970)

Proprieties of wheat mitochondria, study of substrates, co-factors and inhibitors.
Physio. Plant 39 : 312-322

SRIVASTAVA H.K. (1970)

Studies of biochemical bases of mitochondrial heterosis in wheat (triticum aestivum linn)
Thèse

SARKISSIAN I.V., SRIVASTAVA H.L. (1971)

Mitochondrial polymorphisme III heterosis complementation and spectral properties of purified cytochrome oxydase of wheat.
Bioch. Gen. 5 : 57-63

SHULL G.H. (1948)

What is heterosis ?
Gen. 33 : 439-446

SHULL G.H. (1952)

Beginning of the heterosis concept. Heterosis
J.W. GOWEN ed. IOWA State College Press 14-48

SEKUZU I., H. MIZUSHIMA, et al. (1967)

Studies of cytochrome oxydase from saccharomyces oviformis
J. Biochem. (Japan) 62 : 710-715

SRERE P.A. (1965)

The sulphydryl groups of citrate condensing enzyme
Biochem. Biophys. Res. commun 18 : 87-91

STOM D.I. and KALABINA (1971)

Composés phénoliques et leurs propriétés physiologiques
Alma. Acta 82-84

SURESH K., SINHA and KHANNA R. (1975

Physiological, biochimical and genetic basis of hétérosis
Advance in Agronomy 27 : 123-174

TANGY J. (1971)

Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les Nicotiana hypersensibles au virus de la mosaïque du tabac souche commune.
Thèse p. : 21-32

.../.

VALLADE J. (1965)

Recherche morphologique et cytologique sur l'embryon d'Elaeis Guineensis Jacq. quiescent et en cours de germination. Mémoire présentée à la faculté des sciences de l'Université de Dijon.

VERLEUR J.D. (1965)

Studies on the isolation of mitochondria from potato tuber tissue
Plant Physiol. 40 : 1003-1007

WHALEY W.G. (1944)

Heterosis
Bot. Rev. 10 : 461-498

WISKICH J.T. (1963)

Préparation and proprieties of sweet potato mitochondria
Plant Physiol. 38 : 594-604

WISKICH J.T. RE. YOUNG and BIALE J.B. (1964)

Metabolic processes in cytoplasmic particles of avocado fruit. VI - Controlled oxidations and coupled phosphorylations
Plant Physiol. 39 : 312-322

WISKICH J.T. (1966)

Respiratory control by isolated apple mitochondria
Nature 212 : 641-642

WISKICH J.T. (1967)

Avocado and apple mitochondria in Methods in Enzymology
Vol X : 122-126
Academic Press New York

ZOBL R., FISCHBECK G., KEYDEL F., LATZLOESPERK G. (1972)

Complementation of isolated mitochondria from several wheat varieties
Plant. Physiol. 50 : 790-791

*

* *